

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Leiter: Prof. Dr. Robert Grosse

**Ribozym- und RNAi-vermittelter Knockdown
des Wachstumsfaktors Pleiotrophin (PTN)
und des PTN-Rezeptors ALK zur funktionellen Analyse
und zur therapeutischen Anwendung im Maus-Tumormodell**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marius Grzelinski
aus Gleiwitz

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am 23.11.2009

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. A. Aigner

1. Korreferent: Prof. Dr. T. Stiewe

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	<i>Tumoren und Tumorentstehung</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Angiogenese und Metastasen</i>	<i>2</i>
1.3	<i>Wachstumsfaktoren und Signaltransduktion in Tumoren.....</i>	<i>3</i>
1.4	<i>Glioblastom, Kolonkarzinom und Hodenkarzinom.....</i>	<i>4</i>
1.4.1	Hirntumoren/Gliome/Glioblastome	4
1.4.2	Kolonkarzinome.....	6
1.4.3	Hodenkarzinome	7
1.5	<i>Pleiotrophin (PTN)</i>	<i>8</i>
1.5.1	Pleiotrophin (PTN) – Entdeckung und Funktion	8
1.5.2	Physiologische Expression von Pleiotrophin	15
1.5.3	Pathologische Expression von Pleiotrophin.....	17
1.6	<i>Der PTN-Rezeptor Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK).....</i>	<i>19</i>
1.6.1	Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) – Entdeckung und Funktion	19
1.6.2	Physiologische Expression von ALK	22
1.6.3	ALK-Fusionsproteine und pathologische Expression in Tumoren	23
1.7	<i>Genetische Knockdown-Werkzeuge</i>	<i>27</i>
1.7.1	Ribozyme	28
1.7.2	RNA-Interferenz	30
1.7.3	Polyethylenimin (PEI) in der Transfektion von Tumorzellen.....	34
1.8	<i>Aufgabenstellung und Zielsetzung.....</i>	<i>36</i>
2	Material und Geräte.....	38
2.1	<i>Geräte</i>	<i>38</i>
2.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>39</i>
2.3	<i>Chemikalien und Puffer</i>	<i>39</i>
2.4	<i>Verwendete Zelllinien und Versuchstiere</i>	<i>40</i>
2.5	<i>Vektoren</i>	<i>41</i>
2.6	<i>Zellkulturmaterialien.....</i>	<i>41</i>
2.7	<i>Rekombinantes PTN, Antikörper, Kits, Enzyme und Marker.....</i>	<i>42</i>
2.8	<i>Primer und Sonden</i>	<i>42</i>

3	Methoden.....	46
3.1	Zellkultur.....	46
3.1.1	Allgemeine Methoden zur Kultivierung der Zellen	46
3.1.2	Transfektion.....	48
3.1.3	Proliferationsassay	50
3.1.4	Weichagarassay	51
3.1.5	Wounding-Assay	53
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	54
3.2.1	Transformation.....	54
3.2.2	Restriktionsanalyse	54
3.2.3	Klonierung verschiedener ALK-Konstrukte	55
3.2.4	DNA-Präparation	58
3.2.5	RNA-Präparation	58
3.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	59
3.2.7	Agarosegelelektrophorese.....	59
3.2.8	Northern Blot	62
3.2.9	RT-PCR	65
3.2.10	Quantitative Real-Time-PCR.....	67
3.2.11	Southern Blot	70
3.3	Protein- und immunchemische Methoden.....	70
3.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	70
3.3.2	PTN-Reinigung.....	71
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	73
3.3.4	Western Blot	75
3.3.5	PTN-ELISA	77
3.3.6	Apoptose-ELISA	79
3.3.7	Immunhistochemische Färbung von Paraffin-fixierten Tumorschnitten	80
3.4	Stabiles Ribozym-Targeting.....	82
3.5	Tierversuche.....	83
3.5.1	siRNA-Targeting	83
4	Ergebnisse	85
4.1	Nachweis der Expression von PTN, MK, ALK und PTPRζ.....	85
4.1.1	PTN-Screening.....	85
4.1.2	ALK-Screening.....	87
4.1.3	MK und PTPRζ -Screening.....	88
4.2	PTN-Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen	89

4.2.1	PTN-Herstellung.....	89
4.2.2	PTN-Reinigung.....	91
4.2.3	Auswirkungen auf das Wachstum von Tumorzellen <i>in vitro</i>	92
4.2.4	Studien mit PTN aus Glioblastomzellen.....	96
4.3	<i>PTN-Einzeltargeting</i>.....	98
4.3.1	Stabile Transfektion mit Ribozymen gegen PTN.....	98
4.3.2	Nachweis der Ribozym-Expression.....	99
4.3.3	Analytik des Expressionslevels von PTN.....	99
4.3.4	Einfluss der PTN-Expression auf die Zellproliferation <i>in vitro</i>	102
4.3.5	Apoptose-Assays.....	110
4.3.6	Einfluss der PTN-Expression auf die Zellproliferation <i>in vivo</i>	111
4.4	<i>ALK-Einzeltargeting</i>.....	114
4.4.1	Stabile Transfektion mit Ribozymen gegen ALK.....	114
4.4.2	Analytik des Expressionslevels.....	114
4.4.3	Einfluss der ALK-Expression auf die Zellproliferation <i>in vitro</i>	116
4.4.4	Einfluss der ALK-Expression auf die Zellproliferation <i>in vivo</i>	121
4.5	<i>Auswirkung dominant-negativer Rezeptor-Mutanten auf das Tumorstadium</i>.....	123
4.5.1	Herstellung der verkürzten Rezeptormutanten ALK-L und ALK-M.....	123
4.5.2	Proliferationsassays.....	124
4.5.3	Weichagarassays.....	126
4.5.4	Proliferationsassay mit anti-PTN-Antikörpern.....	127
4.6	<i>PTN/ALK-Doppeltargeting</i>.....	128
4.6.1	Konstitutive Verminderung der PTN- und Alk-Expression durch stabile Transfektion mit Ribozymen.....	128
4.6.2	Analytik des Expressionslevels von PTN und ALK.....	129
4.6.3	Einfluss der PTN- und ALK-Reduktion auf die Zellproliferation <i>in vitro</i>	131
4.6.4	Einfluss der PTN- und ALK-Reduktion auf die Zellproliferation <i>in vivo</i>	136
4.7	<i>RNAi-basierter PTN-Knockdown</i>.....	138
4.7.1	Stabilisierung der siRNA mit PEI.....	138
4.7.2	PEI-vermittelte siRNA-Einschleusung <i>in vitro</i>	139
4.7.3	Nachweis des PTN-Knockdowns in siRNA behandelten Zellen.....	139
4.7.4	Einfluss der PTN- und ALK-Reduktion auf die Zellproliferation <i>in vitro</i>	140
4.8	<i>PEI/siRNA-basiertes PTN-Targeting im Mausmodell</i>.....	142
4.8.1	Intraperitoneale Applikation von PEI/PTN-siRNA-Komplexen bei tumortragenden Nacktmäusen.....	143
4.8.2	Subkutane Applikation von PEI/PTN-siRNA-Komplexen bei tumortragenden Nacktmäusen.....	144

4.8.3	Immunhistochemische Analyse der Tumorschnitte	144
5	Diskussion.....	146
6	Zusammenfassung.....	159
7	Abstract	161
8	Literaturverzeichnis.....	163
9	Abkürzungsverzeichnis.....	186
10	Anhang.....	188
10.1	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer.....</i>	<i>188</i>
10.2	<i>Danksagung</i>	<i>189</i>

1 Einleitung

1.1 Tumoren und Tumorentstehung

Nach Herz-Kreislaufkrankungen stellen maligne Tumoren mit 2,8 Mio. Sterbefällen pro Jahr die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar (WHO 2005). Zur Behandlung von Tumoren werden neben der operativen Therapie auch die Chemo- und Strahlentherapie eingesetzt. Jedoch ist der Heilungserfolg gerade bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen mit Vorliegen von Metastasen begrenzt. Erweitert wurden diese therapeutischen Mittel durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren von Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren, die für den Aufbau des tumoreigenen Gefäßnetzes mitverantwortlich sind. Ein Beispiel stellt der monoklonale Antikörper Bevacizumab dar, welcher über eine Inaktivierung des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) die Tumorangiogenese und das Tumorstadium reduziert (Hurwitz 2004). Ein weiterer Ansatz besteht in dem Versuch, die Expression von Wachstumsfaktoren und anderen Zielproteinen, die entscheidend sind für die Proliferation oder das Überleben von Tumorzellen, zu verhindern. Aus der Fülle jener potentieller Zielproteine und der Auswahl an verschiedenen Knockout-Mechanismen ergeben sich vielversprechende Möglichkeiten im Hinblick auf ein gezieltes Eingreifen in die Tumorentwicklung und -therapie.

Tumorzellen entstehen aus gesunden Körperzellen, die durch diverse Genmutationen allmählich die Eigenschaften ihres Zellverbandes verloren und die Fähigkeit zu unkontrollierter Proliferation erlangt haben. Das unter physiologischen Bedingungen streng kontrollierte Wachstum einer Zelle, das auf der Balance zwischen Proliferation und Apoptose beruht, entzieht sich durch die veränderten Eigenschaften der neoplastischen Zellen der Kontrolle und kann zur Schädigung des gesamten Organismus führen. Im Laufe der kanzerogenen Transformation, die aus den ineinander übergehenden Etappen der Tumorinitiation, Tumorpromotion und Tumorprogression besteht, erlangen jene Zellen Eigenschaften nicht ausdifferenzierter Embryonalzellen, was u.a. in der Expression veränderter Oberflächenproteine und verschiedener Wachstumsfaktoren sowie einer veränderten Zellmorphologie resultiert. Verantwortlich für diese Vorgänge sind Schädigungen des genetischen Materials einer Zelle, die durch

unterschiedliche Umwelteinflüsse (chemische oder physikalische Noxen und virale Infektionen) oder aufgrund genetischer Erkrankungen entstehen. Dabei treten zahlreiche Mutationen von Genen auf, die u.a. Proto-Onkogene oder Tumorsuppressorgene wie z.B. p53 oder PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) betreffen können und als Auslöser der Transformation (Initiation) fungieren (Parsons and Simpson 2003; Haupt and Haupt 2006). Dieses Phänomen wird als „*malignant switch*“ bezeichnet. Resultat ist die aberrante Expression normaler oder mutierter Proteine, darunter Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie Transkriptions- und Apoptosefaktoren, was zu einer Veränderung der Zellphysiologie und malignem Tumorwachstum führen kann. Es sind häufig Wachstumsfaktoren und Rezeptoren betroffen, die essentiell für die Entwicklung des Herkunftsgewebes der entarteten Zellen zuständig sind. Tumorzellen mit konstitutiv aktivierten Wachstumsfaktorsignalwegen haben einen gravierenden Wachstumsvorteil gegenüber den umliegenden Zellen und können sich im weiteren Verlauf der Tumorigenese in der Regel selektiv behaupten. Zusammen mit der Zellimmortalisierung durch Störung der Apoptose und des unkontrollierten Zellwachstums ist insbesondere der Verlust der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation verantwortlich für die Invasion und Metastasierung der entarteten Zellen. Hinzu kommt die Fähigkeit zum Aufbau eines tumoreigenen Gefäßnetzes, welches wiederum die Möglichkeit zur weiteren lokalen Expansion des Tumors birgt.

1.2 Angiogenese und Metastasen

Als Angiogenese (Gefäßentstehung) bezeichnet man das Wachstum von Blutgefäßen, überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Es handelt sich um einen streng regulierten Prozess, der während der Ontogenese sowie bei der Wundheilung physiologisch abläuft. Pathologische Angiogenese findet im Rahmen der Entwicklung eines tumoreigenen Gefäßsystems statt. Erreicht ein Tumor eine Größe von ca. 1-2 mm³ und damit einen verhältnismäßig großen Abstand zum versorgenden Gefäß, stagniert sein Wachstum. Über die Expression und Sekretion von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) oder FGF (Fibroblast Growth Factor) induzieren die Tumorzellen die Gefäßneubildung, was mit dem Begriff des „*angiogenic switch*“ (Folkman 2006) beschrieben wird. Proteasen degradieren lokal die Basalmembran der Gefäße und verdauen die extrazelluläre

Membran der umliegenden Zellen. Es kommt zu einer Migration der Endothelzellen und zur Gefäßaussprossung. Die anschließend in den Tumor einwachsenden Kapillargefäße versorgen den Tumor mit Nährstoffen und ermöglichen auf diese Weise ein weiteres Wachstum. Zudem ergibt sich die Möglichkeit für bestimmte Tumorzellen ("*metastasis stem cells*"), über das Gefäßsystem in tumorferne Gebiete zu gelangen, und sich dort anzusiedeln und auszubreiten (Metastasierung) (Weidner, Semple et al. 1991). Die auf diesem Weg entstehenden Metastasen zeigen in der Regel ein ähnliches Expressionsprofil wie der Primärtumor (Weigelt, Glas et al. 2003).

1.3 Wachstumsfaktoren und Signaltransduktion in Tumoren

Wachstumsfaktoren gehören zu Signalmolekülen, die interzellulär, gewebespezifisch, organspezifisch oder sogar im gesamten Organismus agieren können. Dazu zählen Cytokine, Peptidhormone und andere biologische Faktoren, die Zellteilung, Proliferation und Wundheilung steuern. Viele der Wachstumsfaktoren weisen eine strukturelle und evolutionäre Verwandtschaft auf und werden daher in Familien mit ähnlichen Wirkungsweisen gruppiert. Die Funktion einiger Faktoren, wie z.B. FGF, VEGF, EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), NGF (Nerve Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor) und BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) ist inzwischen relativ gut erforscht.

Tumoren exprimieren oft in großen Mengen Wachstumsfaktoren, die sie selbst zum Wachstum benötigen. Diese Stimulation kann entweder auf der Autostimulation der Tumorzellen basieren (autokrine Stimulation) oder auf der Wachstumsanregung von umliegenden Tumorzellen (parakrine Stimulation). Diese Art der Förderung des eigenen Wachstums wurde bereits bei diversen Tumorentitäten beschrieben wie z.B. beim Mammakarzinom (Stimulation mit EGF durch HER-Rezeptoren) und Prostatakarzinom (Stimulation mit FGF1 durch den FGF-Rezeptor) (Kwabi-Addo, Ozen et al. 2004). Plattenepithelkarzinome des Kopfes und des Halses stimulieren sich ebenfalls autokrin über die EGF-Kaskade und beim kolorektalen Karzinom wurde autokrine Stimulation durch VEGF beobachtet (Astsaturov, Cohen et al. 2006; Carrato, Gallego-Plazas et al. 2006).

Neben ihrer physiologischen Funktion spielen Wachstumsfaktoren wegen ihrer mitogenen und transformierenden Eigenschaften eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren. Viele dieser Faktoren dienen ferner als Marker zum Nachweis von Neoplasien in der klinischen Tumordiagnostik. In der letzten Zeit werden Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren schließlich zunehmend in der antitumoralen Therapie mit Hilfe verschiedener Techniken herunterreguliert oder inhibiert. Mittlerweile werden in der klinischen Behandlung von Tumoren z.B. monoklonale Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab), HER-2 (Trastuzumab) und EGFR (Cetuximab) mit Erfolg eingesetzt (Kalofonos and Grivas 2006).

1.4 Glioblastom, Kolonkarzinom und Hodenkarzinom

1.4.1 Hirntumoren/Gliome/Glioblastome

Hirntumoren sind bösartige Neubildungen der Meningen und des Gehirns. Die Inzidenz liegt bei ca. 10/100.000 pro Jahr mit einem Altersgipfel zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr und im Kindesalter. Dabei sind Tumoren neuroepithelialen Ursprungs (Gliome) mit über 50% die am häufigsten auftretenden hirneigenen Tumore beim Menschen. Zu den Gliomen zählen Astrozytome, Glioblastome, Oligodendrogliome, Medulloblastome, Neurinome, Gangliozytome und -blastome, Spongioblastome, Ependymome, Plexustumoren und Pinealome. Astrozytome sind die häufigsten Gliome und werden nach ihrem Malignitätsgrad, wie in nachstehender Übersicht dargestellt, eingeteilt.

Einteilung der Astrozytome nach der WHO (World Health Organization) Klassifikation

WHO Grad	WHO Klassifikation	5-Jahres-Überlebensrate
I	Pilozytisches Astrozytom	50%
II	Diffuses Astrozytom	30%
III	Anaplastisches Astrozytom	10%
IV	Glioblastom	0-3%

Astrozytome sind bevorzugt im Marklager des Frontalhirns und der Temporallappen, seltener Parietal- oder Okzipitallappen lokalisiert. 25% der primären Hirntumoren sind Astrozytome, bei Kindern 50% der Hirntumoren. Therapeutisch steht die Resektion im Vordergrund, die aber nur durchführbar ist, wenn dies ohne großen Funktionsverlust möglich ist. Unterstützend stehen noch die Strahlentherapie sowie die Chemotherapie zur Verfügung. Prinzipiell besteht bei allen Tumoren die Gefahr des Übergangs in ein hochmalignes Glioblastom. Rezidive sind noch nach Jahrzehnten möglich, wobei das Phänomen der malignen Progression beobachtet wird, wonach Rezidive häufig einen höheren Malignitätsgrad als der Primärtumor aufweisen.

Glioblastome entsprechen histologisch dem Astrozytom Grad IV und sind hochmaligne (Kleihues and Ohgaki 2000). Sie zeichnen sich durch rasches Wachstum und Bildung von neuen Gefäßen aus und haben eine starke Neigung zur Entwicklung von perifokalen Hirnödemen, die zu einem raschen Anstieg des intrakraniellen Drucks und Massenverschiebung führen. Histologisch zeigt sich ein vielgestaltiges Bild mit Zellpolymorphie, Nekrosen, Riesenzellen, Blutungen und zystischen Tumorzellzerfallshöhlen. Lokalisiert sind sie meist im Marklager der frontalen und parietalen Gehirnhemisphären, liegen aber auch diffus vor. Männer sind von dieser Erkrankung doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Erkrankungsgipfel sind um das 40. und um das 60. Lebensjahr (Schwartzbaum, Fisher et al. 2006). Wegen der oft intrazerebralen Lokalisation an neurofunktionell unverzichtbaren Stellen ist die operative Exzision oft nicht durchführbar, so dass nur die konservativ/palliativen Maßnahmen wie Strahlen-, Chemo-, und Glukokortikoidtherapie bleiben. Mit einer mittleren Überlebenszeit ohne Therapie von 4-5 Monaten bzw. mit Therapie 12 Monaten hat das Glioblastom eine extrem schlechte Prognose, die sich unter anderem auch aus der Tatsache ergibt, dass es selbst bei radikal entfernten Glioblastomen fast ausnahmslos zum Rezidiv kommt. Rezidive treten in der Regel entweder am gleichen Ort wie der Primärtumor auf oder seltener in einem anderen Bereich des Gehirns.

Das sekretierte Wachstumshormon PTN wird von Glioblastomen verglichen mit gesundem adulten Hirngewebe vermehrt exprimiert (Powers, Aigner et al. 2002; Zhang, Mabuchi et al. 2004). Für alle Gliome des WHO-Grades III und IV konnte die Expression von PTN nachgewiesen werden.

1.4.2 Kolonkarzinome

Karzinome des Kolons und des Rektums machen über 95% der Darmtumoren aus und sind bei Frauen die zweithäufigste Tumorentität nach dem Mammakarzinom sowie die dritthäufigste nach dem Prostata- und Bronchialkarzinom bei Männern. Die Neuerkrankungsrate in Deutschland liegt bei ca. 60000 pro Jahr und ist die höchste in der EU. Die Mortalität bei Männern beträgt 30-35/100000 und 20-25/100000 bei Frauen. Hereditäre (familiäre adenomatöse Polyposis) und chronisch-entzündliche Erkrankungen des Darms (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa), Übergewicht, mangelnde Bewegung, Nikotin, übermäßiger Alkoholkonsum und fettreiche Ernährung begünstigen die Entstehung von Kolonkarzinomen. Die wichtigsten Risikofaktoren sind jedoch hohes Alter und das Vorkommen von Darmpolypen, die häufig über zunächst gutartige Vorstufen (Adenome) im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz entarten können. Die Entartungswahrscheinlichkeit richtet sich nach der Adenomgröße, dem histologischen Adenomtyp und dem Grad der Entdifferenzierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie den Markern, die im Tumorgewebe und im Serum detektiert werden.

Zu den Kolonkarzinomen zählen Tumoren, die im Zökum, Colon ascendens, Colon transcendens und sigmoideum lokalisiert sind, im Gegensatz zu den im rektosigmoidalen Übergang vorkommenden Neoplasien, die zu den Rektumkarzinomen gezählt werden. Nach der WHO-Klassifikation ist das polypöse Adenokarzinom der häufigste Kolonkarzinomtyp gefolgt vom muzinösen Adenokarzinom und Siegelringzellkarzinom sowie einigen anderen, sehr seltenen Karzinomformen. Das kolorektale Primärkarzinom kann das umliegende Gewebe infiltrieren bzw. lymphogen oder hämatogen metastasieren. Die einzige Therapie dieser lange asymptomatisch verlaufenden Erkrankung bietet momentan die operative Resektion mit eventueller adjuvanter Chemotherapie (Courtney, Melville et al. 2004). Seit Kurzem werden ebenfalls blockierende Antikörper gegen die Tumorrezeptoren VEGFR und EGFR eingesetzt (Bevacizumab, Cetuximab und Panitumumab) (Yang, Jia et al. 1999; Yang, Jia et al. 2001; Culy 2005; Davies and Goldberg 2008; Jean and Shah 2008).

1.4.3 Hodenkarzinome

In Deutschland erkranken ca. 10/100.000 pro Jahr an einem malignen Keimzelltumor des Hodens. Grundsätzlich kann zwischen Seminomen und Nicht-Seminomen unterschieden werden. Der Altersmedian von Nicht-Seminomen liegt bei 27, von Seminomen bei 36 Jahren. Seminome machen mehr als die Hälfte aller Hodenkarzinome aus. Neben den germinalen Hodentumoren, zu denen Seminome und Nicht-Seminome gehören gibt es noch seltene nicht-germinale Tumoren wie Leydig-Zell-Tumoren, Sertoli-Zell-Tumoren sowie weitere Tumoren des Keimstrang-Stromas (Gonadoblastome, Adenokarzinome, Rete testis, Hodensarkome, Mesotheliome und Karzinoide). Zu den Risikofaktoren gehören gestörter Hodenabstieg (Maldescensus testis), unilateraler Hodentumor sowie eventuell Hodenatrophie, Mumpsorchitis und familiäres Vorkommen. Infertilität kann potentiell ebenfalls mit einem Hodentumor zusammenhängen. Etwa 10% aller Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien eines Hodentumors entwickeln eine zerebrale Metastasierung, die die Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit auf etwa 2-5% senkt. Die Behandlung des Primärtumors basiert auf einer Orchidektomie (Entfernung des Hodens) neben der adjuvanten Chemo- und Strahlentherapie (Houldsworth, Korkola et al. 2006; Rustin and Rehman 2008).

In der Keimbahn liegt ein Übergang der Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (2N) zu Gameten mit nur einem Chromosomensatz (N). Keimzelltumoren sind fast immer hyperdiploid bzw. sogar tri- oder tetraploid. Diese Hyperploidie führt die verfrühte Chromosomenverdopplung im neoplastischen Entartungsprozess der Keimzellen herbei, der in der Anaphase der Meiose stattfindet. Das Isochromosom i12p des kurzen Arms des Chromosoms 12 ist neben einigen Deletionen ein spezifischer genetischer Marker für Keimzelltumoren (Krausz and Looijenga 2008).

Die molekulare Basis der Tumorigenese der Keimzellkarzinome wurde aufgrund der abundanten Präsenz zahlreicher Wachstumsfaktoren in männlichen Gonaden noch nicht aufgeklärt. Neben dem Einfluss der VEGF-Expression auf die Metastasierungsfähigkeit von Seminomen scheint die Inaktivierung des SMAD4-Gens die Funktionalität der TGF- β -Signaltransduktion zu beeinflussen (Devouassoux-Shisheboran, Mauduit et al. 2003).

1.5 *Pleiotrophin (PTN)*

1.5.1 Pleiotrophin (PTN) – Entdeckung und Funktion

Der sekretierte, Heparin-bindende Wachstumsfaktor Pleiotrophin (PTN) ist ein Cytokin mit einem Molekulargewicht von 18kDa bzw. 15,3kDa (Splicing-Variante), der initial im Zusammenhang mit der Induktion der Aussprossung von Neuriten in Neuronen-, Neuroblastom- und Nebennierenkarzinom-Kulturen von entdeckt wurde (Rauvala 1989; Kuo, Oda et al. 1990; Hampton, Marshak et al. 1992; Rauvala, Vanhala et al. 1994). Parallel dazu wurde die wachstumsfördernde Fähigkeit von PTN (dort HBGF-8 genannt, siehe Tabelle auf S.12) auf Fibroblasten sowie Endothel- und Epithelzellen beschrieben (Milner, Li et al. 1989; Leo, Giaccia et al. 2004).

PTN gehört zusammen mit Midkine, das eine Sequenzhomologie von 55% aufweist (Milner, Shah et al. 1992; Schulte, Lai et al. 1996) zur Proteinfamilie sezernierter, Heparin-bindender, Matrix-assoziiertes, basischer Wachstumsfaktoren und ähnelt funktionell, jedoch nicht strukturell der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Zhang and Deuel 1999). PTN und Midkine wirken über die gleichen Rezeptoren (Stoica, Kuo et al. 2001; Stoica, Kuo et al. 2002) und ähneln sich in ihren zahlreichen biologischen Aktivitäten (Rauvala 1989; Li, Milner et al. 1990; Hampton, Marshak et al. 1992).

Pleiotrophin weist einen hohen Gehalt an Lysinresten auf und ist dadurch basisch (Isoelektrischer Punkt bei pH = 10,1). Ein Signalpeptid von 32 Aminosäuren sorgt für die Sekretion von PTN und das Vorliegen von fünf Disulfidbrücken verleiht dem Wachstumsfaktor eine hohe Stabilität unter diversen pH- und Ionen-Bedingungen (Deuel, Zhang et al. 2002; Leo, Giaccia et al. 2004). Pleiotrophin bindet an Heparin, Heparinsulfate und Syndekane, die als Vertreter der Glykosaminoglykane zu den Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) gehören (Raulo, Chernousov et al. 1994; Kojima, Katsumi et al. 1996; Kilpelainen, Kaksonen et al. 2000). Die Speicherung eines immobilisierten Wachstumsfaktors in der räumlichen Nähe von Zellverbänden begünstigt die Proliferationseffekte durch die Haptotaxis und ist von großer Bedeutung während des Auswachsens von Nervenzellfortsätzen (Axogenese) und Gefäßen (Angiogenese) (Rauvala, Vanhala et al. 1994). Nach Verletzungen oder während des

Wachstums kann PTN auf diese Weise nach der Auflösung der ECM durch Matrixmetalloproteasen freigesetzt werden und die Migration und Proliferation direkt beeinflussen. Für die Funktion von PTN bei der Induktion der Neuritenausprossung sorgen die beiden β -Faltblatt-Abschnitte, die den Thrombospondin-Typ-1 Sequenzmotiven entsprechen (Hoffmann, Schmidt et al. 1998; Rauvala, Huttunen et al. 2000). Dieser Abschnitt kann gemäß den von Thrombospondin-1 bekannten Effekten ebenfalls bei der Angiogenese und Apoptose eine Rolle spielen. Einige neuere Studien postulieren die Lage der Proliferations-stimulierenden Domäne im N-terminalen Bereich von PTN und der Angiogenese-Domäne am C-terminalen Ende von PTN (Zhang, Zhong et al. 2006). Die Lysin-reichen Abschnitte sollen dabei eine Rolle bei der Bindung an Co-Rezeptoren spielen.

Die hochkonservierten 10 Cysteinreste sind bei beiden Splicing-Varianten von PTN vorhanden und sind für die Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich, die ihrerseits für die korrekte Faltung vonnöten sind (Wellstein, Fang et al. 1992). Diese Tatsache erschwert die rekombinante Expression eines biologisch aktiven PTN in prokaryontischen oder Insektenzell-Expressionssystemen (Raulo, Julkunen et al. 1992).

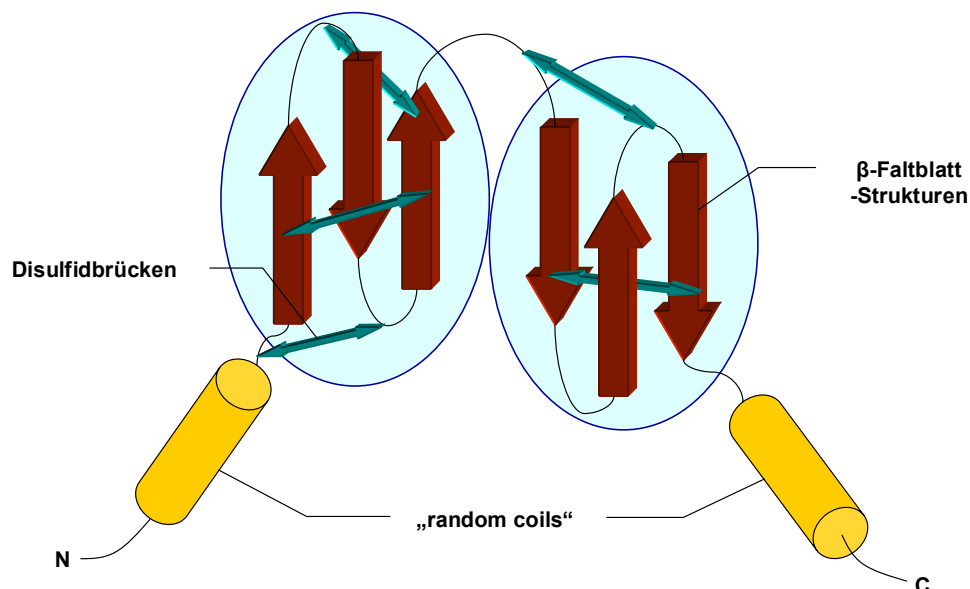


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von Pleiotrophin

Pleiotrophin ist in vielen Arten (Mensch, Maus, Ratte, Rind und Huhn) hochkonserviert und kommt in zwei Varianten vor: 18kDa (Fang et al., 1992) und 15,3kDa (Lu, Jong et al. 2005). Die kürzere Variante entsteht durch posttranslationales, C-terminales Splicing aus der 18kDa-Variante und weist eine andere biologische Aktivität auf (Lu, Jong et al. 2005). Sowohl die 15,3kDa-PTN-Variante als auch Midkine binden an den ALK-Rezeptor (gehört zu den Transmembran-Rezeptor-Tyrosinkinasen) und aktivieren dessen Tyrosinkinaseaktivität (Stoica, Kuo et al. 2001; Bowden, Stoica et al. 2002; Lu, Jong et al. 2005). Die 18kDa-PTN-Variante wie auch wiederum Midkine können ferner alternativ an den Rezeptor PTPR β/ζ binden und ihn aktivieren (Maeda, Nishiwaki et al. 1996; Maeda and Noda 1998; Muramatsu 2002). Der Wirkungsmechanismus ist hierbei jedoch einzigartig. PTN inaktiviert den PTPR β/ζ -Rezeptor und begünstigt die Autophosphorylierung der „downstream“ befindlichen Substrate (β -Catenin, β -Adducin, Fyn, GIT-1-Cat und P190RhoGAP) (Meng, Rodriguez-Pena et al. 2000; Kawachi, Fujikawa et al. 2001; Pariser, Ezquerra et al. 2005; Pariser, Herradon et al. 2005; Pariser, Perez-Pinera et al. 2005; Tamura, Fukada et al. 2006). Es wurde kürzlich noch ein alternativer Weg der ALK-Stimulation über PTPR β/ζ beschrieben (Perez-Pinera, Chang et al. 2007; Perez-Pinera, Zhang et al. 2007). PTPR β/ζ phosphoryliert dabei indirekt die katalytische Domäne von ALK nach der Bindung von PTN und sorgt so für eine Aktivierung des PTN-Rezeptors. Bei den Wechselwirkungen von PTN und Midkine an der Zelloberfläche sind Heparin- und Chondroitinsulfate von Syndekanen beteiligt. Diese Transmembran-Proteoglykane unterstützen dabei die eigentliche Bindung an die jeweiligen Rezeptoren (Deepa, Yamada et al. 2004). Die Abbildung 1.2 veranschaulicht die Signaltransduktion von PTN und Midkine über die entsprechenden Rezeptoren.

Das humane Pleiotrophin-Gen befindet sich auf dem Chromosom 7 Band q33 und umfasst fünf Exons, die eine mRNA mit 1650bp kodieren (Li, Hoffman et al. 1992). In der Promotorregion, die statt der TATA-Box eine CAAT-Box enthält, befinden sich Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren wie z.B. cAMP, HOX-A5, FOX-2, AP-1 und β -Catenin-TCF/LEF. PTN scheint im Wnt-Signalweg involviert zu sein und seine Expression kann durch die TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Hu, Liu et al. 2006; Li, Hu et al. 2006). Der AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex, der aus Fra-1, JunD und Phospho-C-Jun besteht, konnte durch Wasserstoffperoxid in einer

Prostatakarzinomzelllinie aktiviert werden und führte ebenfalls zu einer erhöhten PTN-Expression (Polytarchou, Hatziapostolou et al. 2005). Diese Autoren berichteten auch von der FGF-2 (indirekt über den AP-1-Komplex) vermittelten Induktion der PTN-Expression (Hatziapostolou, Polytarchou et al. 2006). Daher wurde in diesem Zusammenhang eine Kooperativität zwischen beiden Wachstumsfaktoren postuliert. In der Ontogenese reguliert der Homöobox-Transkriptionsfaktor HOX-A5 durch Bindung an den PTN-Promotor seine Aktivität (Chen, Rubin et al. 2005).

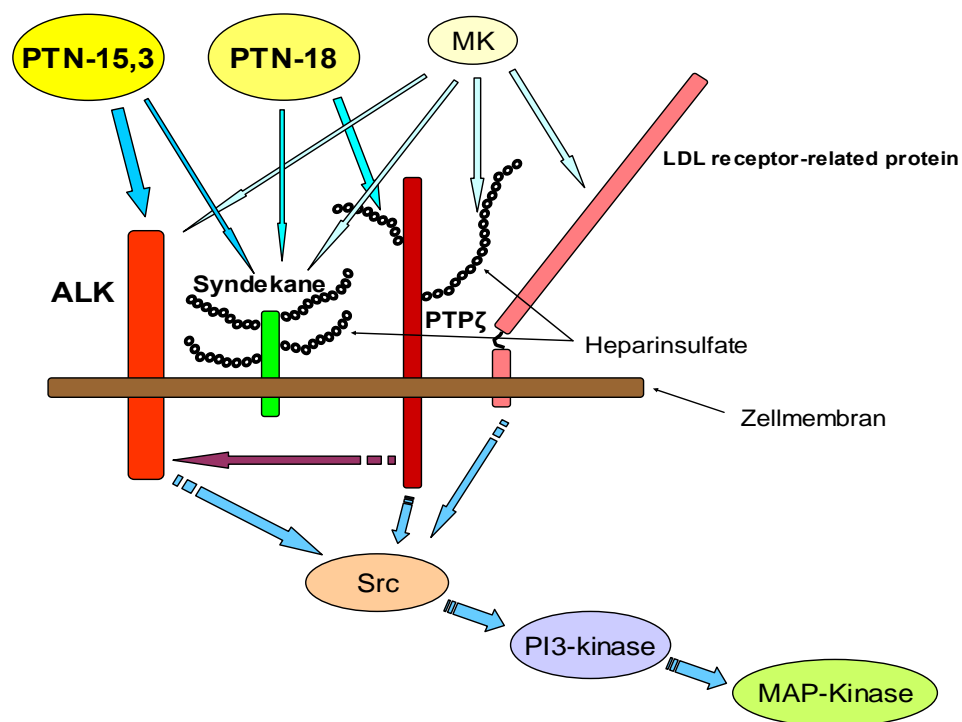


Abbildung 1.2. Signaltransduktion von PTN und Midkine

PTN wurde ursprünglich aus verschiedenen Geweben (Plazenta, Knochen, fötales Gehirn, Uterus und Mammakarzinom) gereinigt und 1990 erstmals von Li et al. sowie Merenmies und Rauvala kloniert (Li, Milner et al. 1990; Merenmies and Rauvala 1990). Der von diesen Arbeitsgruppen kreierte Name für diesen Wachstumsfaktor beruht auf der Fähigkeit von PTN, in diversen Zelltypen und Geweben eine Vielzahl von Effekten hervorzurufen. Neben den bereits erwähnten Eigenschaften wurden mitogene, transformierende, chemo- und haptotaktische und angiogene Funktionen von PTN beschrieben.

Liste der Pleiotrophin-Bezeichnungen:

Bezeichnung	Abkürzung	Literatur
Heparin-Binding Growth-Associated Molecule	HB-GAM	(Rauvala 1989; Merenmies and Rauvala 1990)
Heparin-Binding Growth Factor 8	HBGF-8	(Milner, Li et al. 1989)
Heparin-Binding Neurite Promoting Factor	p18	(Rauvala, Pihlaskari et al. 1989; Kuo, Huang et al. 1990)
Heparin-Binding Neurite Promoting Factor	HBNF	(Kovesdi, Fairhurst et al. 1990)
Osteoblast Specific Factor	OSF-1	(Tezuka, Takeshita et al. 1990)
Heparin Affin Regulatory Protein	HARP	(Courty, Dauchel et al. 1991a)
Heparin-Binding Neurotrophic Factor		(Böhlen and Kovesdi 1991; Böhlen, Müller et al. 1991)
Pleiotrophin	PTN	(Li, Milner et al. 1990; Li, Hoffman et al. 1992)

Pleiotrophin wirkt wachstumsfördernd auf Fibroblasten (Milner, Li et al. 1989; Li, Milner et al. 1990; Fang, Hartmann et al. 1992), Epithelzellen (Fang, Hartmann et al. 1992; Wellstein, Fang et al. 1992; Laaroubi, Delbe et al. 1994; Delbe, Vacherot et al. 1995) und Endothelzellen (Courty, Dauchel et al. 1991b; Fang, Hartmann et al. 1992; Laaroubi, Delbe et al. 1994; Schulte and Wellstein 1997; Yeh, He et al. 1998; Papadimitriou, Heroult et al. 2000). Während der Entwicklung des Großhirns wirkt PTN haptotaktisch auf die neuronalen Stammzellen, die daraufhin entlang der radialen Glia aus der Subventrikularzone in die Rindenschichten migrieren (Matsumoto, Wanaka et al. 1994a; Matsumoto, Wanaka et al. 1994b; Kadomatsu and Muramatsu 2004). PTN beeinflusst außerdem die Entwicklung neuromuskulärer Verbindungen in motorischen Endplatten durch Zytoskelettveränderungen (Muramatsu 2002).

Die protoonkogenen Eigenschaften von PTN konnten in einer Studie mit rekombinant, konstitutiv PTN-exprimierenden NIH3T3-Fibroblasten gezeigt werden. Die Zellen erlangten nach der Transfektion die Fähigkeit, im Weichagar Kolonien zu bilden, und entwickelten sich nach subkutaner Injektion in athymischen Nacktmäusen zu gut

vaskularisierten Tumoren (Chauhan, Li et al. 1993). Neuere Studien zeigten, dass PTN die epithelial-mesenchymale Transition stimuliert und unmittelbar in malignen Umgestaltungsprozesse der Zellumgebung involviert ist (Perez-Pinera, Alcantara et al. 2006; Chang, Zuka et al. 2007). In dort durchgeführten Tierexperimenten stimulierte PTN die Ausbildung von größeren, Kollagen- und Elastin-reicheren Blutgefäßen. Fibroblasten, die gemeinsam mit PTN-exprimierenden Mamma-CA-Zellen kultiviert wurden, exprimierten daraufhin etablierte Angiogenesefaktoren wie Proteinkinase C δ (PKC δ) und Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) (Chang, Zuka et al. 2007). Experimente mit prämaligen Nebennierenkarzinomzellen zeigten ebenfalls eine PTN-induzierte Transformation in hochmaligne Zellen mit metastatischem Potential (Fang, Hartmann et al. 1992; Wellstein, Fang et al. 1992; Czubayko, Smith et al. 1994; Zhang, Zhong et al. 2006).

Daneben wurde PTN als Angiogenesefaktor in Endothelzellen enthüllt (Courty, Dauchel et al. 1991b). In Cornea-Assays an Kaninchen konnte eine PTN-induzierte Vaskularisierung der Hornhaut festgestellt werden (Laaroubi, Delbe et al. 1994; Choudhuri, Zhang et al. 1997). Die Position der Angiogenese-stimulierenden Domäne (AA 69-136) wurde in Studien mit trunkierten PTN-Mutanten lokalisiert und es konnte gezeigt werden, dass die für die Transformation verantwortliche Domäne hingegen auf die Lysin-reichen C- und N-terminalen Regionen sowie den Abschnitt zwischen den Aminosäuren 41 bis 64 des PTN-Proteins beschränkt ist (Zhang and Deuel 1999). PTN agiert als wichtiges Signalmolekül in der Entwicklung der murinen Aorta (Ezquerria, Herradon et al. 2004; Herradon, Ezquerria et al. 2004) und fördert dort die Elastin- und Prokollagensynthese. Kollagenfragmente stimulieren das Wachstum von diversen Karzinomtypen und wirken anti-apoptotisch durch die Aktivierung der ERK-Signalkaskade (Ruhl, Sahin et al. 1999). In Endothelzelllinien konnte außerdem gezeigt werden, dass PTN für die Migration und Gefäßausbildung verantwortlich ist (Polykratis, Delbe et al. 2004; Polykratis, Katsoris et al. 2005). Im Gegensatz zum Pleiotrophin beruhen die angiogenen Eigenschaften von Midkine in *in vivo* Modellen lediglich auf einer indirekten Aktivierung der Interleukin-Expression (IL-8) (Sumi, Muramatsu et al. 2002).

Im Zusammenhang mit PTN wurde ferner eine anti-apoptotische Aktivität beschrieben (Bowden, Stoica et al. 2002; Mi, Chen et al. 2007) und die Fähigkeit, die Proteolyse und die Aktivität des Plasminogenaktivators in Endothelzellen zu induzieren (Kojima, Inui et al. 1995; Kurtz, Schulte et al. 1995; Schulte, Lai et al. 1996). In *In-vitro*-Studien konnte durch PTN die Umwandlung von aktivierten Makrophagen / Monocyten in Endothelzellen während der Neovaskularisierung beobachtet werden (Sharifi, Zeng et al. 2006; Chen, Campbell et al. 2009).

In einer Melanomzelllinie mit nativ hoher PTN-Expression konnte gezeigt werden, dass PTN für den malignen Phänotyp unentbehrlich ist (Czubayko, Schulte et al. 1996). Die Tumorzelllinien wurden mit Ribozymen (katalytische RNA-Moleküle) transfiziert, die gegen die PTN-mRNA gerichtet waren, und verloren infolgedessen größtenteils ihre Tumorigenität. Sie bildeten weniger Kolonien im Weichagar aus und kleinere Tumoren im Tierversuch (Czubayko, Riegel et al. 1994). Bei diesen Tumorzellen konnte interessanterweise auch eine Abnahme der Angiogenese beobachtet werden. In einer Mammarkarzinomzelllinie konnte ein ähnlicher Effekt nachgewiesen werden. In Studien mit verkürzten PTN-Mutanten und synthetischen Peptiden (dominant-negative Effektoren) konnte der Verlust der mitogenen Eigenschaften und des malignen Phänotyps sowie Angiogenesestörungen beobachtet werden (Zhang, Zhong et al. 1997; Bernard-Pierrot, Delbe et al. 2002; Hamma-Kourbali, Bernard-Pierrot et al. 2008). Ähnliche Effekte wurden nach der Spaltung von PTN durch Plasmin und die Matrix-Metalloprotease-2 erzielt (Polykratis, Delbe et al. 2004; Dean, Butler et al. 2007). Natives PTN kann außerdem die durch VEGF vermittelte Migration und Angiogenese von Endothelzellen inhibieren, indem es an VEGF bindet und eine Aktivierung des VEGFR verhindert (Heroult, Bernard-Pierrot et al. 2004). In FGFR-negativen Stammzellen wurde eine erhöhte Vaskularisierung und veränderte Gefäßmorphologie beobachtet, die mit der Abnahme des Interleukins IL-4 und einem Anstieg der PTN-Expression einherging (Magnusson, Dimberg et al. 2007).

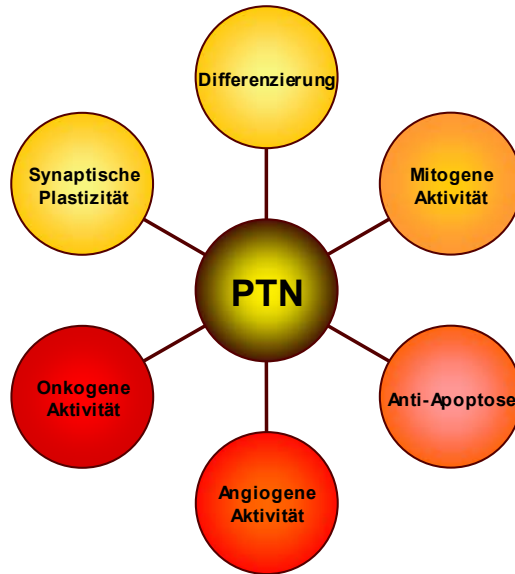


Abbildung 1.3. Vielfalt der PTN-vermittelten Effekte

1.5.2 Physiologische Expression von Pleiotrophin

PTN besitzt zahlreiche physiologische und pathologische Funktionen und Effekte in diversen Zell- und Gewebetypen. Die native Expression von PTN ist streng zeitlich und zelltypspezifisch reguliert (Li, Milner et al. 1990) und findet hauptsächlich in der Embryonalphase und in der initialen Postnatalphase statt (Hampton, Marshak et al. 1992; Yeh, He et al. 1998). PTN scheint in dieser Periode eine Schlüsselrolle in der neuronalen Entwicklung zu spielen (Silos-Santiago, Yeh et al. 1996; Brunet-de Carvalho, Raulais et al. 2003). Während der Ontogenese wird PTN im Mesoderm und Neuroektoderm exprimiert, das Endo- und Ektoderm zeigen hingegen keine PTN-Expression. Die höchste Aktivität von PTN wurde an der Oberfläche von ausdifferenzierenden Zellen und in Basalmembranen von Organen, die epithelial-mesenchymale Interaktionen zeigten, nachgewiesen (Mitsiadis, Salmivirta et al. 1995). Die höchsten PTN-mRNA-Konzentrationen wurden im Zentralnervensystem (ZNS) gemessen (Li, Milner et al. 1990; Böhlen and Kovesdi 1991; Vanderwinden, Mailleux et al. 1992; Kurtz, Schulte et al. 1995; Fan, Muramatsu et al. 2000), mäßige Expression findet jedoch auch in anderen Organen, wie Lunge, Magen-Darm-Trakt, Nieren, Osteoprogenitoren und Chondroblasten statt (Tezuka, Takeshita et al. 1990; Bloch, Normand et al. 1992; Vanderwinden, Mailleux et al. 1992; Zhang, Yan et al. 1997; Lehmann, Schinke et al. 2004). Die erhöhte Aktivität von PTN im Nervengewebe deckt

sich mit der von Rauvala et al. beobachteten Fähigkeit der Stimulation des Neuritenwachstums (Rauvala, Pihlaskari et al. 1989) und unterstreicht seine Bedeutung für die Entwicklung glialer und neuronaler Zellen. Zellkulturversuche und Tierexperimente an Ratten zeigen, dass PTN ebenfalls in der Osteogenese sowie in der Typ I Kollagen-Synthese durch Chondrozyten als Signalfaktor involviert ist (Imai, Kaksonen et al. 1998; Tare, Oreffo et al. 2002a; Tare, Oreffo et al. 2002b).

Die postnatale Expressionsintensität von PTN nimmt signifikant ab (Merenmies and Rauvala 1990; Garver, Radford et al. 1994; Kurtz, Schulte et al. 1995) und bleibt in wenigen Organen auf einem nur niedrigen Niveau bestehen (Rauvala 1989; Merenmies and Rauvala 1990; Vanderwinden, Mailleux et al. 1992). In adulten Individuen manifestiert sich die mäßige PTN-Expression lediglich in bestimmten Hirnarealen wie z.B. Hippocampus, Cortex, Cerebellum und Riechkolben (Böhlen and Kovesdi 1991; Böhlen, Müller et al. 1991; Lai and Lemke 1991; Lai, Czubayko et al. 1992; Wanaka, Carroll et al. 1993). Lediglich nach ischämischen Hirninfarkten kommt es zu einer verstärkten PTN-Expression in Makrophagen, Endothelzellen und aktivierten Astrozyten (Takeda, Onodera et al. 1995; Yeh, He et al. 1998).

Außerhalb des Gehirns konnte PTN in der Iris, im Magen, in den Knochen und Ovarien sowie im Uterus und in Leydig-Zellen der Hoden nachgewiesen werden (Vanderwinden, Mailleux et al. 1992; Imai, Kaksonen et al. 1998). In Studien mit adulten Nagetieren konnte gezeigt werden, dass PTN die synaptische Plastizität bei der Entstehung von Gedächtniszellen im Gehirn beeinflusst (Lauri, Taira et al. 1996; Amet, Lauri et al. 2001). PTN agiert dort als induzierbares Signalmolekül, das die Langzeitpotenzierung im Hippocampus hemmt. Ferner scheint PTN die Regeneration von reaktivierten Astrozyten nach einem Schlaganfall zu begünstigen (Iseki, Hagino et al. 2002; Kadomatsu 2005). Nach Leberverletzungen kommt es zu einem Hypoxie-induzierten Anstieg der PTN-Expression in Sternzellen (HSC-Zellen), was eine mitogene Wirkung auf primäre Hepatozyten ausübt und die Geweberegeneration zu unterstützen scheint (Antoine, Tag et al. 2005). Ob PTN damit direkt unter der Kontrolle des Hypoxie-induzierten Faktors steht ist jedoch unklar, denn der Anstieg der PTN-Expression könnte eventuell indirekt durch andere Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) bewirkt werden und PTN weist nicht alle Elemente eines funktionellen

„Hypoxie-Response-Elements“ auf (Antoine, Tag et al. 2005). Der Wachstumsfaktor PDGF hat ebenfalls einen potentiellen Einfluss auf die PTN-Expression. Die Analyse des PTN-Gens offenbarte das Vorhandensein einer Region, die durch PDGF aktiviert werden kann, was auf eine Signalabfolge hindeutet (Li, Gurrieri et al. 1992; Yeh, He et al. 1998). Ferner scheint auch der Wachstumsfaktor FGF2 auf der einen Seite die PTN-Expression zu induzieren und auf der anderen Seite PTN für seine eigene Funktion zu benötigen (Hatzia Apostolou, Polytarchou et al. 2006).

1.5.3 Pathologische Expression von Pleiotrophin

Die Verknüpfung zwischen der Expression von Pleiotrophin und einer humanen Krebserkrankung gelang erstmalig durch die Detektion und anschließende Isolation aus einer hochmalignen Mammakarzinomzelllinie (MDA-MB-231) (Lupu, Wellstein et al. 1992). In Tierversuchen mit kultivierten Melanomzellen mit verminderter PTN-Expression bestätigte sich die Annahme, dass PTN mitogene und angiogene Eigenschaften besitzt (Czubayko, Riegel et al. 1994; Wu, Barusevicius et al. 2005). Erhöhte PTN-Konzentrationen im Serum, sowie eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration und der Tumorgroße wurden bei Patienten mit Pankreaskarzinomen und Kolonkarzinomen festgestellt (Souttou, Juhl et al. 1998). Nach der Resektion dieser Tumoren kommt es interessanterweise wieder zu einem Abfall der PTN-Konzentration. Weitere Studien zeigten ebenfalls eine signifikant höhere PTN-Konzentration in humanen Mammakarzinomen verglichen mit gesundem Brustgewebe (Relf, LeJeune et al. 1997), wo allerdings auch geringe PTN-Mengen nachgewiesen werden konnten (Garver, Radford et al. 1994). In Lungenkarzinomstudien erwies PTN sich als weniger wichtig für die Tumorentwicklung. Dort war Midkine signifikant erhöht und schien die PTN-Funktion zu erfüllen (Garver, Chan et al. 1993). Die PTN-mRNA wurde bisher in folgenden Tumorzelllinien und Tumoren bzw. Biopaten ermittelt:

Tumorentität	Literatur
Cervixkarzinom	(Chopra, Dinh et al. 1998; Moon, Park et al. 2003)
Chorionkarzinom	(Schulte, Lai et al. 1996)
Glioblastom	(Zhang, Zhang et al. 2004)
Hodenkarzinom	(Aigner, Brachmann et al. 2003)

Lungenkarzinom	(Jager, Noll et al. 1997)
Magen- und Kolonkarzinom	(Souttou, Juhl et al. 1998)
Mammakarzinom	(Wellstein, Fang et al. 1992)
Melanom	(Czubayko, Liaudet-Coopman et al. 1996)
Neuroblastom	(Nakagawara, Milbrandt et al. 1995)
Ovarialkarzinom	(Chopra, Dinh et al. 1996; Nakanishi, Kadomatsu et al. 1997)
Pankreaskarzinom	(Souttou, Juhl et al. 1998; Weber, Klomp et al. 2000; Klomp, Zernial et al. 2002)
Prostatakarzinom	(Vacherot, Caruelle et al. 1999; Hatziapostolou, Delbe et al. 2005)
Teratom und Nephroblastom	(Tsuitsui et al., 1993)

In einer Studie mit am Pankreaskarzinom erkrankten Patienten manifestierte sich in 75% der Untersuchten eine deutlich erhöhte PTN-Expression (Weber, Klomp et al. 2000). Patienten mit multiplen Myelomen wiesen ebenfalls eine krankheitsbedingte Erhöhung der PTN-Konzentration im Serum auf (Yeh, Chen et al. 2006; Chen, Gordon et al. 2007) und auch bei Prostatakarzinompatienten konnte eine direkte Korrelation zwischen dem PTN-Level und der Malignität der Neoplasie festgestellt werden (Vacherot, Caruelle et al. 1999). In Tumoren, die sich von neuroektodermalen Zellen ableiten, z.B. im Neuroblastom, wurde eine hohe PTN-Aktivität im Serum von Patienten (Nakagawara, Milbrandt et al. 1995; Soulie, Heroult et al. 2004) und in abgeleiteten Zelllinien entdeckt (Barthlen, Flaadt et al. 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden für Gliomzelllinien (Mentlein and Held-Feindt 2002; Mentlein and Held-Feindt 2003; Soulie, Heroult et al. 2004; Zhang, Mabuchi et al. 2004) und Glioblastoma multiforme (Zhang, Zhang et al. 2004) ermittelt. Bei Meningiomen fand man statt des Pleiotrophins signifikant erhöhte Mengen des funktionell fast identischen Midkine (Tong, Mentlein et al. 2007).

Untersuchungen über das Vorkommen von Angiogenesefaktoren bei Krebspatienten belegten deutlich erhöhte PTN-Konzentrationen im Serum (Kuroi and Toi 2001), was

für eine Studie über Bronchialkarzinome (SCLC und NSCLC) ebenfalls zutraf (Jager, List et al. 2002). In einer Screening-Studie von (Aigner, Brachmann et al. 2003) konnte sogar ein 20-fach erhöhter PTN-Serumspiegel bei Hodenkarzinompatienten nachgewiesen werden. Mausstudien zeigten außerdem, dass eine Überexpression von PTN in Mammakarzinomzelllinien zu einer verstärkten Endothelproliferation und erhöhter Gefäßdichte führt (Choudhuri, Zhang et al. 1996; Choudhuri, Zhang et al. 1997). In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass die C-terminale Domäne von PTN für den sogenannten „angiogenic switch“ verantwortlich ist (Zhang, Zhong et al. 2006). Die Tatsache, dass der PTN-Spiegel während eines akuten ischämischen Gehirnfalles bei Mäusen und Ratten ansteigt, deutet auf eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisierung geschädigten Gewebes hin und bestätigt seine angiogenen Eigenschaften (Takeda, Onodera et al. 1995; Muramatsu 2002; Christman, Fang et al. 2005a; Christman, Fang et al. 2005b). Außer dem neoplastisch bedingten PTN-Anstieg konnte eine erhöhte Konzentration an PTN in Läsionen, die beim Alzheimer- und Down-Syndrom auftreten, nachgewiesen werden (Wisniewski, Lalowski et al. 1996).

1.6 Der PTN-Rezeptor Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)

1.6.1 Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) – Entdeckung und Funktion

Über Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) wurde anfänglich im Zusammenhang mit dem großzelligen anaplastischen T-Zell-Lymphom (ALCL), einem Subtyp der Non-Hodgkin-Lymphome, berichtet (Bullrich, Morris et al. 1994; Morris, Kirstein et al. 1994; Shiota, Nakamura et al. 1995). In diesen Studien wurden ALK-Fusionsproteine identifiziert, die durch Translokationen und andere chromosomale Aberrationen entstehen. Die Fusion mit dem Protoonkogen Nucleophosmin (Grisendi, Bernardi et al. 2005) führt z.B. zu einer konstitutiven Aktivierung von ALK und gilt bei Lymphom-Patienten als negativer prognostischer Faktor (Li, Takino et al. 2007). Obwohl ALK in der klinischen Medizin schon relativ lange einen etablierten Tumormarker darstellt, galt er zunächst als „Orphan Rezeptor“, da seine Sequenz und Vorkommen zwar bekannt waren, aber keine natürlichen Liganden vorlagen.

Auch die Bedeutung von PTN während der Ontogenese und bei diversen Neoplasien war bis dahin relativ gut erforscht ohne die Kenntnis eines konkreten Rezeptors. Erst vor einigen Jahren gelang die Entdeckung der PTN-ALK-Wechselwirkung in Screening-Studien mit cDNA-Phagen-Display-Datenbanken (Stoica, Kuo et al. 2001). Dort konnte die Bindung von ALK an das immobilisierte PTN mit einer Dissoziationskonstante von ca. $K_d = 32$ nachgewiesen werden. Neben PTN wurde auch der Retinolsäure-induzierbare Wachstumsfaktor Midkine als ALK-Ligand identifiziert (Stoica, Kuo et al. 2002). Diese Arbeitsgruppe konnte außerdem noch zeigen, dass PTN eine wachstumsfördernde Wirkung auf ALK-exprimierende Zellen ausübt, die durch eine ALK-Überexpression noch verstärkt werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PTN bei ALK-positiven Zellen über die MAP-Kinase-Kaskade anti-apoptotisch wirkt (Bowden, Stoica et al. 2002). In Studien mit Glioblastomzelllinien erwies ALK sich ebenfalls als Schlüsselfaktor bei der PTN-vermittelten mitogenen und anti-apoptotischen Wirkung (Powers, Aigner et al. 2002). Hier konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase Akt in die Übermittlung der PTN-vermittelten Signale über ALK involviert ist. Analog zu diesem Befund wurden die mitogenen Effekte von PTN durch die Ribozym-vermittelte Verminderung der ALK-Expression in Nebennierenkarzinomzellen vollständig aufgehoben (Bowden, Stoica et al. 2002).

ALK stellt eine klassische Tyrosinkinase aus der Familie der Insulinrezeptoren dar und weist ein Molekulargewicht von ca. 200kDa auf. Die Insulinrezeptor-Familie umfasst neben ALK noch die Rezeptoren IGF-IR, LTK, TRK, MET und cROS (Fantl, Johnson et al. 1993; Barbacid 1995). Im Aufbau ähnelt ALK der Leukozyten-Tyrosinkinase (Shiota, Fujimoto et al. 1994a; Iwahara, Fujimoto et al. 1997; Morris, Naeve et al. 1997) sowie anderen Tyrosinkinasen und besteht aus einer extrazellulären Liganden-Bindedomäne, einem hydrophoben Transmembran-Abschnitt und einer zytoplasmatischen Domäne mit katalytischer Funktion (Schlessinger 2000). Die Abbildung 1.4 verdeutlicht schematisch den Aufbau des ALK-Rezeptors.

Sobald ein Ligand an ALK andockt, kommt es zu einer Dimerisierung beider ALK-Untereinheiten mit einer anschließenden Transphosphorylierung der eigenen Tyrosinreste. Die so aktivierten Tyrosinreste werden von Effektor- und Adapterproteinen erkannt, die wiederum imstande sind, im weiteren Verlauf mehrere

Signaltransduktionskaskaden auszulösen (RAS/ERK, JAK/STAT3, PI3K). Dabei spielen Adaptermoleküle wie SRC, SHC, GRB2, IRS-1, PLC- γ , PI3 und der Transkriptionsfaktor STAT3 eine wichtige Rolle (Bai, Dieter et al. 1998; Bai, Ouyang et al. 2000; Stoica, Kuo et al. 2001; Zamo, Chiarle et al. 2002; Motegi, Fujimoto et al. 2004; Chiarle, Simmons et al. 2005; Moog-Lutz, Degoutin et al. 2005). ALK entfaltet auf diese Weise sein onkogenes Potential hinsichtlich der Proliferation, Apoptose, Zytoskelettveränderungen und veränderter Zellmorphologie (Kuefer, Look et al. 1997; Wellmann, Doseeva et al. 1997; Zhang, Raghunath et al. 2002; Chiarle, Gong et al. 2003; Ambrogio, Voena et al. 2005). Die von PTN bekannte Stimulation des Neuriten-Auswachsens konnte ebenfalls für ALK bestätigt werden (Motegi, Fujimoto et al. 2004). Dieser Effekt konnte mit Hilfe von niedermolekularen Inhibitoren eindeutig der Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs zugeordnet werden.

Neuere Studien definieren ALK als einen in Apoptose-Prozesse involvierten „*dependence receptor*“, der in konstitutiv aktiven Fusionsproteinen oder nach Liganden-Bindung eine anti-apoptotische Aktivität entfaltet und beim Ausbleiben der Aktivierung pro-apoptotisch wirkt (Mourali, Benard et al. 2006). Diese Gruppe lokalisierte ebenfalls die für dieses Phänomen verantwortliche Erkennungssequenz für die Caspase-abhängige Spaltung von ALK in der Juxtamembran-Domäne.

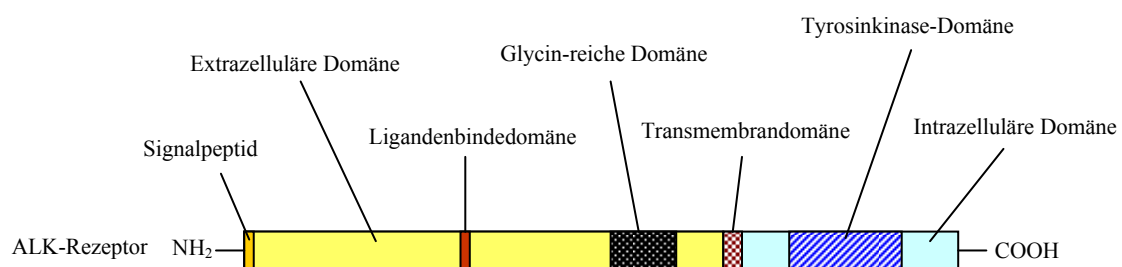


Abbildung 1.4. Struktur der Rezeptor-Tyrosinkinase ALK

1.6.2 Physiologische Expression von ALK

Das humane und das murine ALK-Gen wurde im Jahre 1997 zum ersten Mal kloniert (Iwahara, Fujimoto et al. 1997; Morris, Naeve et al. 1997). Auch in *Drosophila* konnte ALK lokalisiert werden (Loren, Scully et al. 2001). Das dort DAlk genannte Gen befindet sich auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms.

Die ALK-cDNA kodiert zunächst für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 177kDa und erst im Laufe von post-translationalen Modifikationen (z.B. N-Glykosylierung) entsteht das finale ALK-Protein (Morris, Naeve et al. 1997; Pulford, Lamant et al. 1997; Lamant, Pulford et al. 2000). Die große Übereinstimmung zwischen dem humanen, murinen und *Drosophila*-ALK zeigt, dass es sich bei diesem Rezeptor um ein hoch konserviertes Protein handelt. ALK besteht aus einer einzigen Polypeptid-Kette und die PTN/MK-Bindestelle befindet sich im extrazellulären Bereich zwischen den Aminosäuren 391 und 401 (Stoica, Kuo et al. 2001; Stoica, Kuo et al. 2002). Daneben existiert noch eine N-Glykosylierungs-Stelle (Asn-X-Ser/Thr) und einer Region, die für die Ligandenspezifität verantwortlich ist (Iwahara, Fujimoto et al. 1997; Morris, Naeve et al. 1997). Die Transmembran-Domäne besteht aus 28 Aminosäuren gefolgt von der Juxtamembran-Domäne, die eine Erkennungssequenz für IRS-1 enthält. Die katalytische Tyrosinkinase-Domäne besteht aus 254 Aminosäuren und enthält die für die Familie der Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinasen spezifischen Tyrosinpaare. Am C-terminalen Ende befinden sich noch Phosphotyrosin-abhängige Bindestellen für das Adapterprotein SHC und PLC- γ .

Der ALK-Rezeptor wird ähnlich wie sein Ligand PTN primär während der Ontogenese im Zentralnervensystem des Embryos exprimiert und seine Aktivität in adulten Organismen beschränkt sich auf limitierte Bereiche und pathologische Prozesse (Hurley, Clary et al. 2006; Verneris, Khoo et al. 2006). ALK-mRNA wurde im Thalamus, Hypothalamus, Mittelhirn, Riechkolben und Ganglien detektiert (Morris, Kirstein et al. 1994; Iwahara, Fujimoto et al. 1997). Nach der Geburt verringert sich die Expressionsrate von ALK und bleibt auf vereinzelte Nervenzellen, Perizyten (Zwischenform zwischen glatter Muskelzelle und Fibroblast) und Endothelzellen des Gehirns beschränkt (Iwahara, Fujimoto et al. 1997; Pulford, Lamant et al. 1997; Falini, Pileri et al. 1999). Studien in der Fruchtfliege belegten die DAlk-Expression im Gehirn,

Ventralganglion, Mesoderm und in der Darmmuskulatur während der Ontogenese (Loren, Scully et al. 2001; Englund, Loren et al. 2003; Lee, Norris et al. 2003).

Die Transfektion der PC-12-Zellen mit autodimerisierenden, konstitutiv aktiven ALK-Mutanten führte zu deren Differenzierung durch Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs (Soultou, Carvalho et al. 2001). Immunocytochemische Experimente in *Drosophila*-Fliegen bestätigten diese Beobachtung (Loren, Scully et al. 2001; Lee, Norris et al. 2003). Dort konnte ebenfalls „Jelly belly“ (JEB) als ALK-Ligand, der den humanen PTN und Midkine entspricht, zugeordnet werden (Englund, Loren et al. 2003; Lee, Norris et al. 2003). JEB wird im Bauch-Mesoderm der *Drosophila* gebildet und unterscheidet sich strukturell deutlich von seinen humanen Pendanten (Weiss, Suyama et al. 2001). Neben der von dieser Arbeitsgruppe beschriebenen Rolle in der Mesoderm Ausbildung gibt es Studien, die eine Beteiligung von JEB in der kardiovaskulären Entwicklung und in DiGeorge-Syndrom (Entwicklungsstörung bei der Anlage von Organen während der Ontogenese) postulieren (Porsch, Hofmeyer et al. 1998; Packham and Brook 2003). Die Überschneidungen bei der Verteilung der ALK- und TRK-Expression führten zu der Annahme, dass ALK auch als Rezeptor für neurotrophische Faktoren fungiert (Barbacid 1995).

1.6.3 ALK-Fusionsproteine und pathologische Expression in Tumoren

Die pathologische Expression von „full-length“-ALK in Tumoren wurde initial in der Rhabdomyosarkom-Zelllinie Rh30 (Morris, Kirstein et al. 1994; Iwahara, Fujimoto et al. 1997; Morris, Naeve et al. 1997; Pulford, Lamant et al. 1997) und anschließend auch in anderen Rhabdomyosarkomen beobachtet (Falini, Bigerna et al. 1998; Cessna, Zhou et al. 2002; Pillay, Govender et al. 2002). Ebenfalls in Neuroblastomen, Tumoren neuroektodermalen Ursprungs, Glioblastomen, Mammakarzinomen, Melanomen und Bronchialkarzinomen konnte der native Rezeptor nachgewiesen werden (Lamant, Pulford et al. 2000; Dirks, Fahnrich et al. 2002; Miyake, Hakomori et al. 2002; Powers, Aigner et al. 2002; Shao, Su et al. 2002; Stoica, Kuo et al. 2002; Osajima-Hakomori, Miyake et al. 2005; Perez-Pinera, Chang et al. 2007; Soda, Choi et al. 2007). In B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen ergaben die immunzytologischen Untersuchungen das Vorliegen von sowohl normalen ALK-Rezeptoren wie auch Fusionsmutanten, ähnlich

wie im Falle der großzelligen anaplastischen Lymphome, die namensgebend für ALK waren (Delsol, Lamant et al. 1997; Touriol, Greenland et al. 2000; Gascoyne, Lamant et al. 2003). ALK dient gegenwärtig der offiziellen Klassifizierung von Lymphomen nach WHO und lässt sie in ALK-negative und ALK-positive ALCLs einteilen.

Genetische Aberrationen, die durch Punktmutationen, Translokationen, Duplikationen und Fusionen mit anderen Genen verursacht werden, führen bei RTKs (Rezeptor-Tyrosinkinasen) oft zu einer Deregulierung der katalytischen Tyrosinkinase-Domäne. Die in den meisten Fällen aktivierende Modifikation des Rezeptors führt oft zu gravierenden zellulären Effekten. Konstitutiv aktive Rezeptor-Tyrosinkinasen induzieren Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation, Transformation, anti-apoptotische Effekte und Therapieresistenz (Kolibaba and Druker 1997; Blume-Jensen and Hunter 2001; Scheijen and Griffin 2002).

Auch im Falle von ALK konnten zahlreiche Fusionsproteine identifiziert und oft mit pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Bis auf zwei Ausnahmen (MSN-ALK und MYH9-ALK) enthalten alle Fusionsproteine die vollständige intrazelluläre Domäne (einschließlich der katalytischen Tyrosinkinase-Domäne) von ALK und besitzen einige weitere Gemeinsamkeiten. Der Fusionspartner befindet sich stets auf der N-terminalen Seite von ALK und stellt immer ein weitverbreitetes Protein dar mit sehr hohen Expressionsraten. Dadurch kommt es in den betroffenen Zellen zu einer aberranten Expression des gesamten Fusionsproteins. Die subzelluläre Verteilung des Fusionsproteins ist ebenfalls durch die Herkunft des Fusionspartners bestimmt (Bischof, Pulford et al. 1997; Mason, Pulford et al. 1998; Hernandez, Pinyol et al. 1999; Tort, Pinyol et al. 2001). Eine weitere Gemeinsamkeit stellt beim Fusionspartner die Anwesenheit von Domänen dar, die für eine Oligomerisierung verantwortlich sind. Diese Motive imitieren eine Liganden-vermittelte Aggregation und sorgen für die konstitutive Aktivierung des ALK-Signalwegs (Fujimoto, Shiota et al. 1996; Bischof, Pulford et al. 1997; Pulford, Falini et al. 1999; Rosenwald, Ott et al. 1999; Ma, Cools et al. 2000; Touriol, Greenland et al. 2000; Trinei, Lanfranccone et al. 2000; Tort, Pinyol et al. 2001). Eine Abwandlung dieses Mechanismus erfolgt bei MSN-ALK (MSN - Mitglied der Familie der Ezrin/Radixin/Moesin-Zytoskelettmoleküle), wo es anstelle

einer Oligomerisierung zur Interaktion mit Membranproteinen und Zusammenlagerung von Fusionsproteinen kommt (Tort, Campo et al. 2004).

Das am Ende der achtziger Jahre entdeckte und bisher am besten erforschte Fusionsprotein NPM-ALK besteht aus der intrazellulären Domäne von ALK und dem Nucleolus-Protein Nucleophosmin, das unter physiologischen Bedingungen für die Zentrosomverdopplung und genomische Stabilität während der Ontogenese zuständig ist (Borer, Lehner et al. 1989) und inzwischen als Tumorsuppressor angesehen wird (Grisendi, Mecucci et al. 2006). NPM-ALK entsteht durch eine chromosomale Translokation (t(2;5)(p23;q35)) und wurde initial in einem Subtyp des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) entdeckt (Morris, Kirstein et al. 1994; Shiota, Fujimoto et al. 1994a; Shiota, Fujimoto et al. 1994b; Pulford, Lamant et al. 1997; Mason, Pulford et al. 1998). Annähernd 80% dieser ALK-positiven ALCLs weisen dieses Fusionsprotein auf (Benharroch, Meguerian-Bedoyan et al. 1998; Drexler, Gignac et al. 2000; Stein, Foss et al. 2000; Greenland, Touriol et al. 2001). Die subzelluläre Verteilung umfasst, bedingt durch NPM, sowohl das Zytoplasma als auch den Zellkern. Das trunkierte, im Fusionsprotein enthaltene NPM besitzt zwar kein Kerntransportsignal mehr, ist jedoch durch seine Oligomerisierungsmotive imstande, Heterodimere mit intakten Nucleophosmin-Molekülen zu bilden (Bischof, Pulford et al. 1997; Mason, Pulford et al. 1998). Solche Heterodimere können durch die Störung der Zentrosom-Proteinkomplexe zu weiteren Chromosomenaberrationen führen (Ventura, Martin-Subero et al. 2004). Aufgrund der Tatsache, dass dank dieser Sequenz ebenfalls Homodimere aus zwei NPM-ALK-Fusionsproteinen entstehen können, umfasst die Lokalisation beide o.g. Zellkompartimente (Cordell, Pulford et al. 1999; Falini, Pulford et al. 1999). NPM-ALK entfaltet in bereits ausgebildeten Tumoren und in diversen Zelltypen des blutbildenden Systems (sowohl B-Zellen wie auch T-Zellen) tumorigene Eigenschaften, was in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte (Kuefer, Look et al. 1997; Nieborowska-Skorska, Slupianek et al. 2001; Slupianek, Nieborowska-Skorska et al. 2001; Chiarle, Gong et al. 2003; Lange, Uckert et al. 2003; Turner, Tooze et al. 2003; Jager, Hahne et al. 2005; Turner and Alexander 2005). Das Fusionsprotein benutzt die gleichen Signaltransduktionswege wie das „full length“-ALK, ist jedoch durch den Fusionspartner NPM konstitutiv aktiviert und liegt in den betroffenen Zellen in höheren Konzentrationen vor als das native Protein. Studien mit NPM-ALK

offenbaren wachstumsstimulierende, transformierende, anti-apoptotische und Therapieresistenz-induzierende Auswirkungen (Bai, Ouyang et al. 2000; Drexler, Gignac et al. 2000; Stein, Foss et al. 2000; Duyster, Bai et al. 2001; Morris, Xue et al. 2001; Raetz, Perkins et al. 2002; Gu, Tothova et al. 2004).

Neben NPM-, MSN und MYH9-ALK gibt es noch zahlreiche weitere ALK-Fusionsproteine, die hauptsächlich in ALCLs und im inflammatorischen myofibroblastischen Tumoren (IMT) vorkommen und dort gravierende Auswirkungen auf neoplastische Prozesse ausüben. Die onkogenen Eigenschaften dieser Chimären variieren oft abhängig von der subzellulären Lokalisation, da die ALK-vermittelte Signaltransduktion auf diese Weise modifiziert werden kann (Armstrong, Duplantier et al. 2004). Eine Aufstellung der bisher entdeckten ALK-Fusionsproteine bietet die Abbildung 1.5.

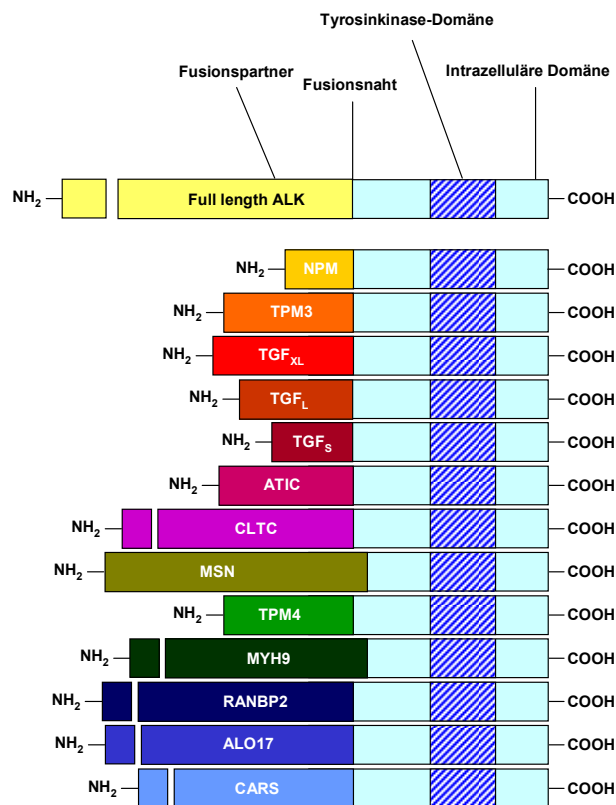


Abbildung 1.5. Fusionspartner von ALK

Trotz der ausgiebigen Studien über ALK und seine Fusionsproteine gibt es in der Vergangenheit keine innovativen therapeutischen Ansätze bei der Heilung von ALCL-Patienten (Fiorani, Vinci et al. 2001). Neben der standardmäßigen Kombinations-Chemotherapie wird bei Risikopatienten noch eine autologe Stammzellen-Transplantation durchgeführt (Fanin, Silvestri et al. 1996; Gascoyne, Aoun et al. 1999). Es wurden zwar einige Tyrosinkinase-Inhibitor- und Adenoviral-basierte Versuche initiiert um ALK-positive ALCLs gezielt zu behandeln (Turturro, Arnold et al. 2002; Turturro 2003; Marzec, Kasprzycka et al. 2005) jedoch stehen diese Studien noch am Anfang. Daher bedarf es weiterer Studien, die neben dem ALK-Rezeptor noch seinen Liganden PTN umfassen um einen detaillierten Einblick in die Prozesse bei der Tumorentstehung und Tumorprogression zu verstehen und diese effizient zu therapieren.

1.7 Genetische Knockdown-Werkzeuge

Die im Zusammenhang mit dem Wachstumsfaktor PTN und seinem Rezeptor ALK beschriebenen tumorigenen Eigenschaften und zahlreiche andere pathologische Prozesse basieren in einem hohen Maße auf der Überexpression der betroffenen Proteine. Eine zielgerichtete und effiziente Verminderung dieser Expression kann zur Aufklärung der Funktionsweise dieser Faktoren führen und potentielle therapeutische Ansätze ermöglichen. Die Manipulation von murinen Stammzellen (Gen-Knockout in Mäuseembryos), die eine Veränderung der Gen-Expression im gesamten Organismus erlaubt, stellt die bekannteste Gentergeting-Methode dar und wird schon relativ lange in der Forschung eingesetzt. Bei der Antisense-Methode handelt es sich wiederum um eine lokale Targeting-Strategie. Dabei verhindern komplementäre RNA- oder DNA-Stränge durch Hybridisierung mit der Ziel-mRNA die Translation. Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei Methoden der Herunterregulierung der Gen-Expression auf mRNA-Ebene eingesetzt: Hammerkopf-Ribozyme und RNA-Interferenz (RNAi). Diese Verfahren liefern ein sehr effektives und exakt steuerbares Werkzeug für die Funktionsanalyse von PTN und ALK und werden nachfolgend etwas näher vorgestellt.

1.7.1 Ribozyme

Ribozyme wurden initial in Ciliaten der Gattung *Tetrahymena thermophila* durch Cech und Altman im Jahre 1981 entdeckt (Cech, Zaug et al. 1981). Diese Forscher bewiesen als erste die katalytischen Eigenschaften von RNA-Molekülen und wurden für diese damals revolutionäre Erkenntnis sieben Jahre später mit einem Nobelpreis für Chemie geehrt. Daneben wurden Ribozyme im Zusammenhang mit dem Spliceosom und der RNA-Prozessierung als autokatalytische RNA-Moleküle (Kruger, Grabowski et al. 1982) und als katalytische Komponente des Enzyms Ribonuklease P beschrieben (Guerrier-Takada, Gardiner et al. 1983).

Aufgrund ihrer Tertiärstruktur und Unterschieden im aktiven Zentrum werden die Ribozyme in drei Subtypen unterteilt:

- Haarnadel (Hairpin) -Ribozyme (Haseloff and Gerlach 1989)
- Hammerkopf (Hammerhead) -Ribozyme (Forster and Symons 1987)
- Hepatitis- δ -Virus-Ribozyme (Wu, Lin et al. 1989)

Die Hammerkopf-Ribozyme, die initial in Pflanzenvirusoiden entdeckt wurden (Forster and Symons 1987) erlauben, sequenzspezifisch eine bestimmte mRNA zu spalten. Die gespaltene mRNA verliert ihre Fähigkeit zur Translation und wird nicht weiter abgelesen. Zusätzlich weist sie ungeschützte 3'- und 5'-Enden auf und wird unmittelbar nach der Ribozym-Aktion von zellulären Ribonukleasen degradiert. Damit stehen keine funktionsfähigen bzw. überhaupt keine mRNAs dieses Gens bei der Translation zur Verfügung und die Proteinexpression wird herunterreguliert.

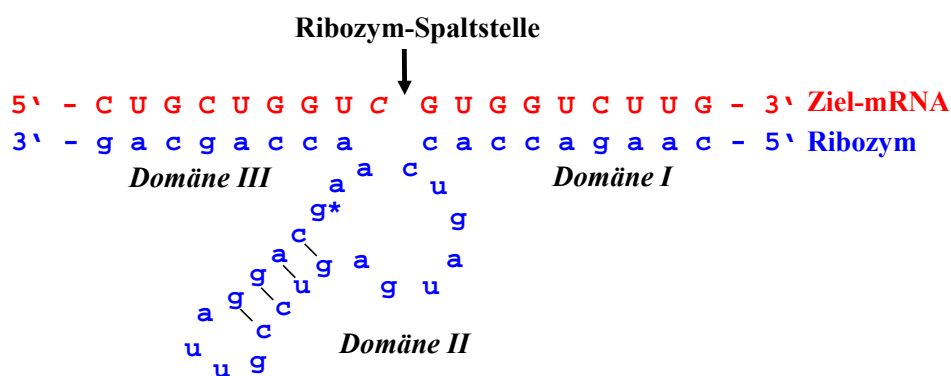


Abbildung 1.6. Hammerkopf-Ribozym

Die Mitte der 1990er Jahre erarbeitete kristallographische Struktur der Hammerkopf-Ribozyme offenbarte das Vorliegen von drei Y-bildenden Helices, die sich in einem aus 11 Nukleotiden bestehenden Kern überschneiden (Pley, Flaherty et al. 1994; Scott, Finch et al. 1995). Die Domänen I und III können abhängig von der Sequenz der Ziel-mRNA frei gewählt werden, müssen jedoch bestimmte Kriterien erfüllen, um die katalytische Aktivität zu garantieren (Haseloff and Gerlach 1988). Sie dürfen keine komplementären Sequenzen enthalten, sollten aus je 6-10 Nukleotiden bestehen und im Idealfall asymmetrisch sein (Tabler, Homann et al. 1994). Die Sequenz der Domäne II ist, um die korrekte Faltung und die katalytische Aktivität zu garantieren, weitgehend festgelegt. Ein Ribozym bindet über die Watson-Crick-Basenpaarung an die komplementären Bereiche der mRNA, was mit der Annäherung des aktiven Zentrums an die Spaltstelle korrespondiert. Die Spaltstelle weist dabei eine spezifische Erkennungssequenz auf, die vom Ribozym erkannt wird (5'-NUX-3' mit N=A, C, G oder U und X=A, C oder U).

Ribozyme können sowohl als DNA-Sequenz auf einem Vektor oder als RNA-Molekül eingesetzt werden. Im ersten Fall kann die Einschleusung in die Zielzelle transient oder stabil erfolgen, bei fertig synthetisierten Ribozymen (RNA) kann ausschließlich eine transiente Transfektion erfolgen. Der Einsatz von Ribozym-Expressionkassetten setzt eine effiziente intrazelluläre Expression und Faltung voraus, während das RNA-basierte „Targeting“ mit der Instabilität einer ungeschützten RNA konfrontiert wird. Um dem zu begegnen, können Ribozyme entweder aufwändig chemisch modifiziert oder mit Transfektionsreagenzien komplexiert werden. Des Weiteren besteht noch die Problematik der Freisetzung und Entfaltung der Wirkung nach der Pino- bzw. Endozytose in der Zelle (Fell, Hudson et al. 1997).

Sofern die Funktion der Ribozyme gewährleistet ist, können funktionelle Studien erfolgen, was in zahlreichen Publikationen dokumentiert worden ist. Mit Hilfe der Ribozyme gelang es beispielsweise die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Metastasierung von Melanomen aufzuklären (Kashani-Sabet, Liu et al. 2002). Auch die proliferativen Eigenschaften von HER-2 auf Tumorzellen wurden im Rahmen einer Ribozym-vermittelten Herunterregulierung identifiziert (Aigner, Juhl et al. 2001; Thybusch-Bernhardt, Aigner et al. 2001). Ribozym-basierte Studien an der Telomerase

bestätigten ihre Funktion bei der Tumorentstehung und stellen einen potentiellen Therapie-Ansatz dar (Liu, Qu et al. 2002; Hao, Luo et al. 2003; Guittat, Alberti et al. 2004). Der Versuch, Ribozyme therapeutisch einzusetzen, wurde darüber hinaus in diversen weiteren Studien verfolgt. Durch den Einsatz von einem Ribozym-basierten Präparat (Heptazym) konnten Erfolge gegen die Replikation des Hepatitis-C-Virus erzielt werden (Foster 2004) und die Hepatitis C-induzierte Apoptose von Hepatozyten konnte ebenfalls mit Ribozymen gehemmt werden (Ryu, Kim et al. 2003). Ferner wurden noch zahlreiche Studien vorgestellt, die Ribozym-vermittelte Therapieansätze bei Erkrankungen wie HIV, Creutzfeldt-Jacob-Syndrom, Familiäre-Amyloid-Polyneuropathie, Retina-Degeneration, Koronargefäß-Erkrankungen (Propsting, Kubicka et al. 2000; Dolzhanskaya, Conti et al. 2001; Abdelmaksoud, Yau et al. 2008; Cao, Qian et al. 2008) beinhalten.

1.7.2 RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz wurde zuerst, ohne den genauen Mechanismus zu kennen, in genetisch modifizierten Petunien beobachtet, wo die Einführung von farbgebenden Konstrukten zum Verlust der Blütenfarbe führte (Napoli, Lemieux et al. 1990). Die Erklärung dieses Mechanismus lieferten jedoch erst Studien in Nematoden der Gattung *Caenorhabditis elegans*. Dort wurde dieser Effekt als Sequenz-spezifisches „Silencing“ charakterisiert, das durch das intrazelluläre Vorliegen doppelsträngiger RNA induziert wird (Fire, Xu et al. 1998). Diese Forscher beabsichtigten, den potentiellen Synergismus der simultanen Benutzung von „sense“- und „antisense“-RNA zu untersuchen und entdeckten dabei, dass dieses Vorgehen eine über zehnfache Verbesserung der „Silencing“-Effektivität bewirkt.

Die RNA-Interferenz stellt einen natürlichen Vorgang in eukaryotischen Zellen dar, der in die Abwehr von Viren und Transposons involviert ist. Die Wirkung zielt auf die Proteinexpression, intrazelluläre Immunantwort und auf die Regulation des Genoms. Dabei kooperieren kleine RNA-Moleküle (bestehend aus 20-26 Nukleotiden) zusammen mit katalytisch aktiven Proteinkomponenten, um doppelsträngige RNA exo- und endogenen Ursprungs abzubauen oder zu inhibieren (Chi, Chang et al. 2003). Der Wirkmechanismus beruht auf der ATP-abhängigen Aktivität von zwei dsRNA-

induzierbaren Protein-Komplexen: DICER und RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (Zamore, Tuschl et al. 2000). Eine intrazellulär vorliegende dsRNA wird zunächst vom DICER erkannt und in 21mere zerschnitten (Hamilton and Baulcombe 1999; Zamore, Tuschl et al. 2000; Bernstein, Caudy et al. 2001; Elbashir, Harborth et al. 2001). Dieser initial in *Drosophila* entdeckte Enzymkomplex enthält zwei RNase-III-Domänen, eine PAZ-Domäne (Piwi-Argonaut-Zwille) und eine C-terminale dsRNA-Bindedomäne. Der Abstand zwischen diesen beiden Domänen wird durch einen Helixbereich bestimmt, dessen Länge die Länge der entstehenden siRNAs bestimmt (Bernstein, Caudy et al. 2001). DICER katalysiert mit Hilfe des AGO2-Proteins (Argonaut 2) den ersten Schritt der RNA-Interferenz, bei dem siRNA-Fragmente entstehen, und initiiert somit die Bildung des RISC. Der aus RNA- und Protein-Anteilen bestehende RISC-Komplex weist vier Domänen auf (Helikase-Domäne, siRNA-Bindedomäne, Exo- und Endonuklease-Domäne) und bindet sowohl an die siRNA als auch an die korrespondierende mRNA. Dabei wird erst die von DICER generierte siRNA mit Hilfe der Helikase-Domäne entwunden und der „antisense“-Strang bleibt im RISC-Komplex als Template erhalten, um die Sequenzspezifität zu garantieren (Hammond, Bernstein et al. 2000; Nykanen, Haley et al. 2001). Danach erfolgt über Watson-Crick-Basenpaarung die Bindung an die Ziel-mRNA und die RNase-Domäne des RISC-Komplexes spaltet diese, was zum Entstehen von Produkten mit ungeschützten Enden und einer anschließenden Degradation durch zelluläre Ribonukleasen führt (Elbashir, Lendeckel et al. 2001). Nach diesem Vorgang wird die Template-RNA wieder freigesetzt und der RISC-Komplex steht für weitere Reaktionen bereit. Die Abbildung 1.7 verdeutlicht den hier beschriebenen Vorgang. In Studien am Schleimpilz *Dictyostellium* konnte gezeigt werden, dass eine dsRNA ohne Zielgen in der Zelle keine signifikante Produktion der siRNA induziert (Martens, Novotny et al. 2002). Diese Befunde implizierten die Annahme, dass siRNA nicht ausschließlich aus eingeschleusten dsRNA-Fragmenten entstehen kann. Andere Gruppen zeigten am *Drosophila*-Modell die Fähigkeit der Induktion der RNA-abhängigen RNA-Polymerase durch den „antisense“-Strang der siRNA als Primer, was zu einer Vervielfältigung der initial eingeschleusten dsRNA führt (Lipardi, Wei et al. 2001; Sijen, Fleenor et al. 2001).

In Pflanzenzellen beschränkt sich die Wirkung der RNA-Interferenz nicht ausschließlich auf die post-transkriptionale Degradation der mRNA. Die siRNA kann dort im Zuge der RNA-abhängigen DNA-Methylierung in der Promotorregion des Zielgens zum „Gene-silencing“ auf Transkriptionsebene beitragen (Mette, Aufsatz et al. 2000). Die RNA-Interferenz stellt einen in der Evolution stark konservierten Mechanismus dar und findet daher in zahlreichen Organismen statt. Interessanterweise interagiert die RNA-Interferenz mit dem Phänomen des „Transposon-Silencings“, indem sie die Transposition der mobilen Elemente verhindert und zur Genomstabilität beiträgt (Tabara, Sarkissian et al. 1999). Zahlreiche Publikationen belegen ferner die signifikante Rolle der RNA-Interferenz in der Abwehr gegen Viren. Doppelsträngige RNA, die abundant im Vermehrungszyklus zahlreicher Viren vorkommt, wird auf diese Weise erfolgreich dezimiert (Mourrain, Beclin et al. 2000; Kumar 2008; Mine and Okuno 2008).

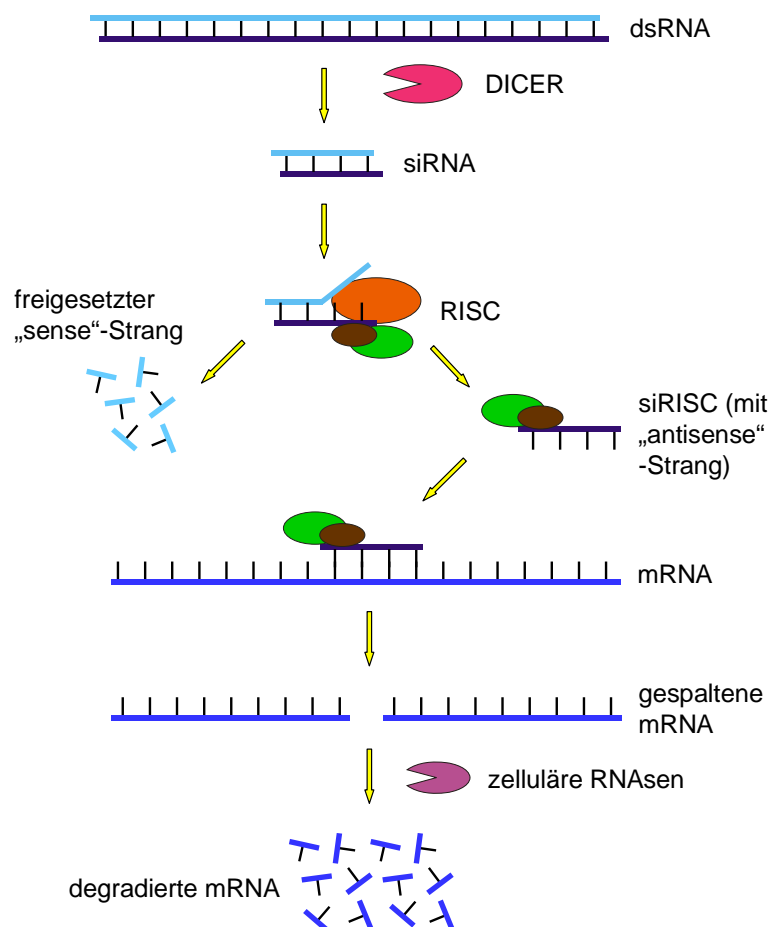


Abbildung 1.7. Prinzip der RNA-Interferenz

Aufgrund der spezifischen und effizienten Wirkungsweise der RNA-Interferenz in der Herunterregulierung der Genexpression in humanen Zellen (Morris, Chan et al. 2004) gab es inzwischen zahlreiche Versuche, dieses Werkzeug therapeutisch bei diversen Krankheiten einzusetzen. Einige Beispiele:

- HIV (Coburn and Cullen 2002; Jacque, Triques et al. 2002; Novina, Murray et al. 2002; Li, Bauer et al. 2003)
- Hepatitis (Hamasaki, Nakao et al. 2003; Kapadia, Brideau-Andersen et al. 2003; McCaffrey, Nakai et al. 2003; Song, Lee et al. 2003; Morrissey, Lockridge et al. 2005; Yokota, Iijima et al. 2007)
- Neurodegenerative Prionen-Erkrankungen (Tilly, Chapuis et al. 2003)
- Chronische Myeloische Leukämie (Wilda, Fuchs et al. 2002)
- SARS und andere respiratorische Virenerkrankungen (Bitko, Musiyenko et al. 2005; Li, Tang et al. 2005)
- Krebserkrankungen (Yin, Gao et al. 2003; Ting, Schuebel et al. 2005; Calin and Croce 2006; Shen, Samul et al. 2006; Kleinman, Yamada et al. 2008)

Der Einsatz der RNA-Interferenz erlaubt es, die funktionelle Relevanz zahlreicher Genprodukte in diversen Modellen zu untersuchen und eröffnet die Möglichkeit der Etablierung neuer Therapien. Die RNA-Interferenz unterscheidet sich vom Ribozym-vermittelten „Silencing“ in der fehlenden intrinsischen katalytischen Aktivität der kurzen RNA-Moleküle (DICER und RISC nötig), und liefert oft bessere „Knock-Down“-Effizienzen. Ähnlich wie im Falle der Ribozyme, kann die siRNA sowohl als RNA-Molekül in die Zelle eingeschleust werden (Elbashir, Lendeckel et al. 2001; Sohail, Doran et al. 2003) oder in Form von Vektor-basierten Expressionskassetten erst in den Zielzellen generiert werden (Paul, Good et al. 2002). Auch die Wahl zwischen der transienten und stabilen Applikation bleibt hiermit offen. Studien mit Ribozymen und siRNAs begegnen jedoch einer gravierenden Problematik. Aufgrund der Anfälligkeit von RNA-Molekülen für die extra- und intrazelluläre (vor allem bei *In vivo*-Studien) Degradation durch die omnipräsenten Ribonukleasen bedarf die Applikation besonderer Vorgehensweisen, um die Aktivität zu gewährleisten. Inzwischen werden in der biomedizinischen Forschung zwar zahlreiche Transfektionsreagenzien eingesetzt, jedoch entfalten einige von ihnen auch

Nebenwirkungen in Säugerzellen (z.B. hohe Toxizität). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein sehr potentes polykationisches Transfektionsreagenz eingesetzt, das Polyethylenimin.

1.7.3 Polyethylenimin (PEI) in der Transfektion von Tumorzellen

Sowohl die molekularbiologische Grundlagenforschung wie auch die gentechnisch basierte Therapie von Erkrankungen setzen in den meisten Fällen eine erfolgreiche Einschleusung der eingesetzten „Silencing“-Konstrukte voraus. Damit diese Konstrukte ihre Wirkung entfalten können, müssen sie die Zelle im intakten Zustand erreichen. Dies gilt vor allem für RNA-basierte Ansätze, die mit dem Handicap der rapiden Degradation behaftet sind. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Effekte hängt beispielsweise stark von der Transfektionsmethode ab (Walters and Jelinek 2002).

Es besteht zwar generell die Möglichkeit, Nukleinsäuren unkomplexiert durch Mikroinjektionen oder Elektroporation zu applizieren, jedoch bedürfen diese Methoden großer RNA-Mengen und liefern teilweise keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Aigner 2006b). Virale Systeme, die sehr hohe Infektionseffizienzen erzielen, können im Zusammenhang mit ihrem immunogenen und onkogenen Potential ebenfalls eine Gefahr für die Empfängerorganismen darstellen (Lungwitz, Breunig et al. 2005). Nicht-virale Transfektionsreagenzien bieten eine sichere und bequeme Alternative dazu und werden in Form von Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion und kationischen Polymeren in der biomedizinischen Forschung erfolgreich eingesetzt (Schatzlein 2001).

Polyethylenimin (PEI) ist ein polykationisches Molekül, das im Rahmen der Polymerisierung aus dem Monomer Ethylenimin entsteht und erstmals von Bousif et al. als Transfektionsreagenz eingesetzt wurde (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995). Diese Gruppe schleuste mit Hilfe von PEI erfolgreich Reporter-Gene in verschiedene Zielzellen ein und zeigte seine Überlegenheit gegenüber Lipopolyaminen. Die Funktion von PEI basiert auf der DNA-Komplexierung durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem positiv geladenen Polymer (Bildung von PEI-DNA-Komplexen) mit einer anschließenden Bindung an die Zellmembran. Dabei bedarf es einer bestimmten Netto-Positivladung der Komplexe, um die Aufnahme in die Zelle zu garantieren. Diese

Netto-Positivladung wird durch ein optimales Verhältnis zwischen den Stickstoffatomen von PEI und den Phosphoraten der DNA/RNA erzielt (N/P-Verhältnis). Bei einer zu geringen Netto-Positivladung (zu viel Nukleinsäure) erfolgt keine Komplex-Aufnahme in die Zelle, während Überschüsse an unkomplexiertem PEI toxisitätsfördernd wirken. Das N/P-Verhältnis muss empirisch ermittelt werden und variiert je nach Zelltyp und PEI. Nach der Aufnahme in die Zelle sind die in den Komplexen enthaltenen Nukleinsäuren durch die Puffereigenschaften von PEI vor einer Degradation in den Lysosomen geschützt. Durch das Vorliegen vieler protonierbaren Stickstoffatome stellt PEI ein Protonenakzeptor mit hoher Ladungsdichte dar, was die Ansäuerung in den Lysosomen und die anschließende enzymatische Spaltung verhindert (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995). Diese Eigenschaft sorgt ebenfalls für den sogenannten „Protonenschwamm-Effekt“ (engl. „proton sponge effect“), bei dem es durch den Protoneneinstrom und einem anschließenden Anstieg der Osmolarität zum Anschwellen und Platzen der Lysosomen kommt (Behr 1997). Die freigesetzten Komplexe zerfallen im Zytoplasma und setzen die Nukleinsäuren frei. Die eingeschleusten Moleküle werden dort aktiv an und entfalten im Falle der siRNA oder Ribozyme ihre Wirkung im Zytoplasma (Schatzlein 2001). Die aus PEI/DNA-Komplexen stammenden DNA-Konstrukte gelangen (Mechanismus bisher unbekannt) in den Zellkern, wo sie integriert werden können. Die Abbildung 1.8 präsentiert vereinfacht das Wirkungsprinzip von Polyethylenimin.

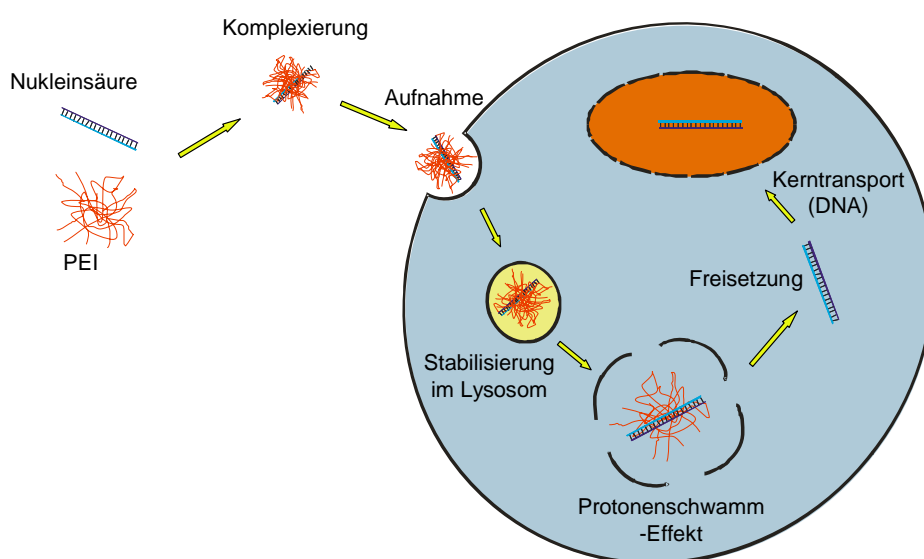


Abbildung 1.8. Funktion von Polyethylenimin (PEI)

Es gibt nur wenige PEIs, die geeignet sind für die Transfektion von Säugerzellen. Die jeweiligen PEI-Typen unterscheiden sich in der Komplexgröße, Toxizität und Komplexstabilität (Wightman, Kircheis et al. 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden das kommerziell erhältliche lineare JetPEI und das verzweigte niedermolekulare F25-PEI aus laboreigener Herstellung eingesetzt. Beide Polymere erlauben eine effiziente Komplexierung von DNA- und RNA-basierten Konstrukten und garantieren einen zuverlässigen Schutz vor der Degradation durch Nukleasen (Godbey, Barry et al. 2000; Aigner, Fischer et al. 2002; Urban-Klein, Werth et al. 2005).

1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Relevanz von Pleiotrophin und vom PTN-Rezeptor ALK beim Wachstum verschiedener Tumorentitäten im Zellkultur- und Tiermodell untersucht werden. Dazu sollten Glioblastom-, Hoden-CA- und Kolon-CA-Zelllinien bezüglich der Expression beider Proteine untersucht und die positiven unter ihnen mittels Ribozym-Targetings herunterreguliert werden. Eine der grundlegenden Fragestellungen war, ob eine gleichzeitige Herunterregulierung von PTN und ALK additive oder synergistische Effekte gegenüber dem Einzeltargeting aufweist. Unsere Hypothese war, dass der doppelte Angriff auf die Signaltransduktionskaskade vor allem unter suboptimalen Targeting-Bedingungen, wie z.B. *in vivo*, vorteilhaft sein müsste. Mittels des siRNA-vermittelten PTN-Knockdowns sollten einerseits Rz-vermittelte Effekte bestätigt werden und andererseits durch den Einsatz von PEI/siRNA-Komplexen zur Behandlung bereits etablierter Tumoren die potentielle therapeutische Anwendung im Mausmodell untersucht werden.

Im Einzelnen sollten folgende Ziele verfolgt werden:

- Screening der Glioblastom-, Hoden-CA- und Kolon-CA-Zelllinien auf ihre PTN und ALK Expression
- Herstellung von rekombinantem PTN und Untersuchung seines Einflusses auf die Proliferation der Tumorzellen

- Herstellung von Zelllinien mit stabil verminderter PTN bzw. ALK-Expression mittels Ribozymen (Rz) (Einzeltargeting)
- Untersuchung der Auswirkungen des Knockdowns auf die Proliferation *in vitro* und auf das Tumorwachstum *in vivo*
- Herstellung und Untersuchung der Auswirkung dominant-negativer ALK-Mutanten und des anti-PTN-Antikörpers auf das Tumorwachstum
- stabiles PTN/ALK-Doppeltargeting mittels Rz
- Untersuchung der Auswirkungen des Doppel-Knockdowns auf die Proliferation *in vitro* und auf das Tumorwachstum *in vivo*
- transientes PTN-Targeting mittels PEI/siRNA
- Untersuchung der Auswirkungen des PEI/siRNA-Targetings von PTN auf die Proliferation *in vitro*
- therapeutisches *in vivo*-Targeting von PTN mittels PEI/siRNA in bereits ausgebildeten Tumoren im Mausmodell

2 Material und Geräte

2.1 Geräte

Brutschrank (Zellkultur)	Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA
Durchlichtmikroskop	Hund, Wetzlar
Electrophoresis Documentation and Analysis System 120	Kodak, Stuttgart
Elx800 (Mikrotiterplattenphotometer)	bio-tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
EI9001-XCELL II™ (Western Blot Transfer)	BioRad Laboratories, München
Feinwaage	Sartorius, München
Gelkammer	BioRad Laboratories, München
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer Instruments, Rodgau-Jügesheim
Helios γ (Photometer)	Unicam Instruments, Cambridge, UK
Hybridisierungssofen	Biometra, Göttingen
Hypercasette™ Expositionskassette	Amersham Biosciences, Freiburg
Image Eraser SF Molecular Dynamics	Amersham Biosciences, Freiburg
Inkubator (wasserummantelt mit CO ₂ -Anlage)	Heraeus, Hanau
LightCycler	Roche Diagnostics, Penzberg
Mikropipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
Millex®-GS syringe driven filter unit (0,22 μ m)	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
Miniprotean II System	BioRad Laboratories GmbH, München
MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Optipure Analytical (Reinstwasseranlage)	MembraPure, Bodenhhausen
pH-Meter GPHR 1400 A	Greisinger Electronic, Regenstauf
Phosphorimager SI	Molecular Dynamics Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphorscreen	Molecular Dynamics Amersham Biosciences, Freiburg
Power Pac 300 Netzteil	BioRad Laboratories, München
Schüttelinkubator	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilbank für die Zellkultur	Heraeus Instruments, Hanau
UV-Schirm	BioRad Laboratories, München
Varioklav® Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach

Zentrifugen Heraeus Instruments, Hanau oder
 DuPont De Nemours, Bad Nauheim

2.2 Verbrauchsmaterialien

BioMax MS Film..... Kodak, Stuttgart
 Hybond™-N Membran..... Amersham Biosciences Europe, Freiburg
 Hyperfilm™ ECL™ Amersham, Freiburg
 Nitrocellulosemembran Schleicher & Schuell, Dassel
 Polystyrol-Rundbodenröhrchen..... Sarstedt, Nümbrecht
 Whatman Papier Whatman International, Maidstone, England
 Zellkulturflaschen..... Sarstedt, Nümbrecht bzw. Greiner Bio-One, Frick
 Zellkulturplatten Cellstar, Briercroft

2.3 Chemikalien und Puffer

Ammoniumperoxodisulfat (APS)..... Sigma, Taufkirchen
 Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)..... Carl Roth, Karlsruhe
 DEPC (Diethylpyrocarbonat) Sigma, Taufkirchen
 DMSO (Dimethylsulfoxid)..... Sigma, Taufkirchen
 dNTP-Mix (10mM) MBI Fermentas, St. Leon-Rot
 Dokumol (SW-Entwickler)..... Tetenal, Norderstedt
 Heparin Sepharose™ Amersham Biosciences, Freiburg
 High Fidelity Polymerase Roche Diagnostics, Mannheim
 LightCyclerKit..... Roche Diagnostics, Mannheim
 LumiGLO™ Reagent and Peroxid Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA
 MgCl₂ (für PCR)..... MBI Fermentas, St. Leon-Rot
 pedGOLD Universal Agarose peqlab Biotechnologie, Erlangen
 pd(N)₆ Random Hexamer Amersham Biosciences Europe, Freiburg
 Phosphatase Substrat Kit PIERCE, Bonn
 QuantiTect-SybrGreen..... Qiagen, Hilden
 RNase Erase™..... MP Biomedicals, Eschwege
 RotiPhorese® Gel 40..... Roth, Karlsruhe

SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase).....	Roche Diagnostics, Mannheim
Salmon Testes DNA	Sigma, Taufkirchen
SDS (sodium dodecyl sulfat).....	Sigma, Taufkirchen
Streptavidin-AP Conjugate.....	Roche Diagnostics, Mannheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma, Taufkirchen
10x Taq Polymerasepuffer.....	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sonstige Labor- und Feinchemikalien.....	Merck, Sigma

2.4 Verwendete Zelllinien und Versuchstiere

U87MG wurde durch Explant-Technik aus einem malignen Gliom gewonnen.

G55T2 wurde durch Selektion auf Tumorigenität aus U87MG – Zellen gewonnen.

T98G ist ähnlich wie U87 eine vom multiformen Glioblastom derivierte Zelllinie. Diese Zelllinie ist immortalisiert und wächst auch kontaktunabhängig. Bei Serummangel können die Zellen jedoch in eine stabile G1-Interphase treten.

NCCIT ist eine Zelllinie, die einem nichtseminomatösen Keimzelltumor entstammt. Dieser Tumor vereint die Eigenschaften eines Karzinoms der Keimzellen mit denen eines embryonalen Tumors.

NT2 ist eine Teratokarzinomzelllinie und ähnelt somit den NCCIT Zellen.

2102Ep ist eine embryonale Krebszelllinie.

LOVO ist eine Zelllinie, die aus einem metastasierenden Kolon-Adenokarzinom der linken supraclavicularen Region hervorgegangen ist.

SW-13 ist eine durch Biopsie entnommene humane, kleinzellige Nebennierenkarzinom-Zelllinie. Diese Zelllinie exprimiert nativ kein PTN und weist keine Kolonienbildung im Weichagarassay auf.

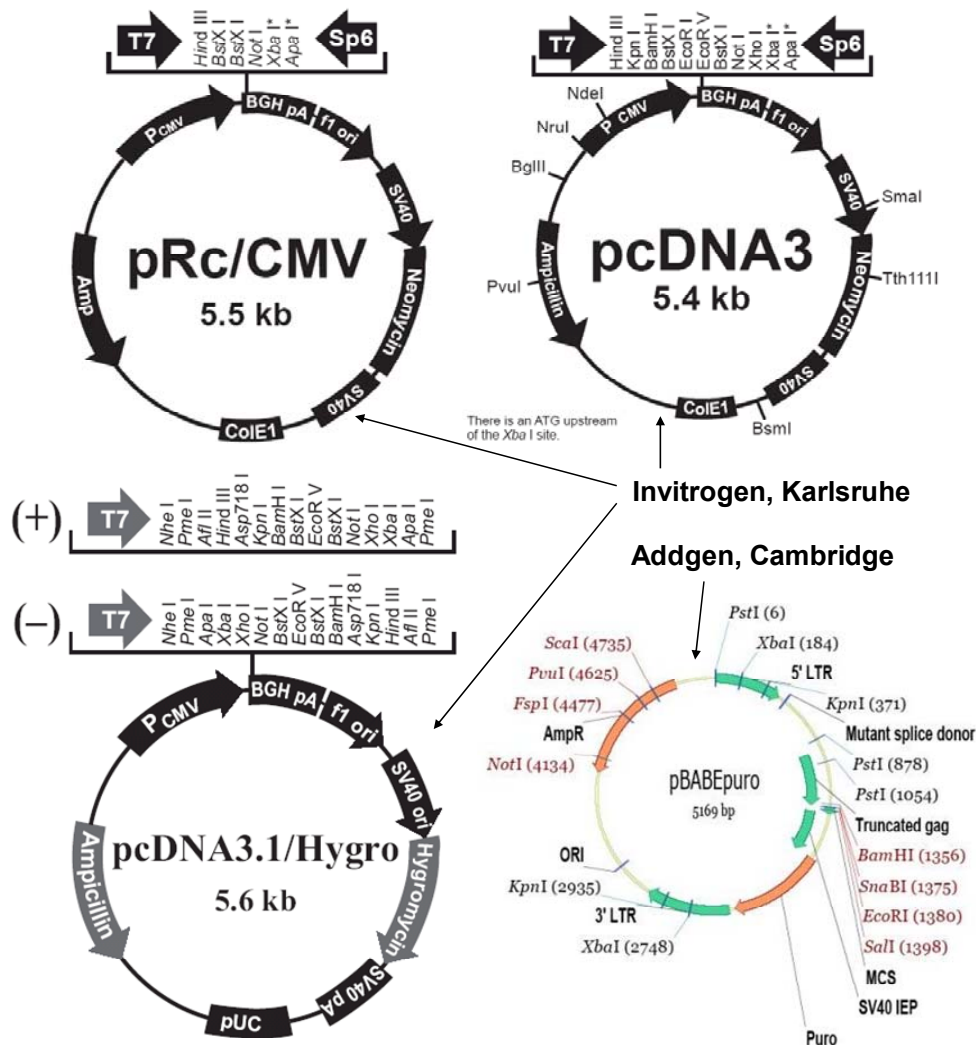
andere Glioblastom-Zelllinien: **U118, G122**

andere Kolon-CA-Zelllinien: **Colon 201, LS174T, LS180, SW480, SW620**

andere Hoden-CA-Zelllinien: **GH**

Versuchstiere: Athymische Nacktmäuse (**FoxN1 nu/nu**)

2.5 Vektoren



2.6 Zellkulturmaterialien

BM-Cyclin.....	Roche Diagnostics, Mannheim
IMDM-Medium.....	PAA Laboratories, Linz, Österreich
IMDM-Medium (10x)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
MycoKill AB	PAA Laboratories, Linz, Österreich
PBS (phosphate buffered saline) steril	PAA Laboratories, Linz, Österreich
RPMI 1640-Medium	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Steriles fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Viralex™ Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, Österreich

2.7 Rekombinantes PTN, Antikörper, Kits, Enzyme und Marker

Recombinant human PTN	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Anti-human Pleiotrophin Detection Antibody	R&D Systems, Minneapolis, USA
Donkey anti goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Goat polyklonal IgG anti PTN	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim
peqGOLD TriFast™ (zur RNA-Extraktion)	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Transcriptor Reverse Transkriptase	Roche Diagnostics, Penzberg
peqGold RNase Inhibitor Plus™ (30 U/μl)	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Taq Polymerase 500U	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PeqGold DNA Leitemix (0,1-10 kbp)	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Prestained Protein ladder (10-180 kDa)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.8 Primer und Sonden

Die PCR-Primer wurden unter Verwendung der Website <http://mgc.nci.nih.gov> abgeleitet. Zur Ableitung der Primer für die quantitative PCR wurde außerdem ein Intron-Spanning-Assay angewandt. Das wichtigste Merkmal dieser Primer ist ihre Spezifität gegenüber den zu detektierenden Nukleotidsequenzen. Sie wurden so konstruiert, dass sie weniger als 20 Nukleotide lang waren und eine Schmelztemperatur zwischen 58 und 68°C aufwiesen. Außerdem sollten sie keine komplementären Sequenzen von mehr als 3 Nukleotiden enthalten. Das gilt sowohl in Bezug auf sich selbst als auch auf den zweiten bei der PCR eingesetzten Primer. Wegen der größeren Bindungsstärke wurde angestrebt, dass die Primer am 3' Ende Guanin oder Cytosin tragen. Die für die PCR benutzten Primer wurden von MWG-Biotech hergestellt. Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden in sterilem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl gebracht.

PCR –Primer:

a) qualitative PCR:

Primer für die PTN-PCR: (PCR-Produkt = 568bp)

sense: 5'-GGTCTCGAGTATGTTCCACAGGTGACATC-3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

antisense: 5'-GGTAAGCTTAGAGGACGTTTCCAACCTCAA-3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

Primer für die ALK-PCR: (PCR-Produkt = 234bp)

sense: 5'-ACGAGGCTGCAAGAGAGATCC-3' $T_m = 66^\circ\text{C}$

antisense: 5'-GTCCCATTTCCAACAAGTGAAGGA-3' $T_m = 68^\circ\text{C}$

Primer für die ALK-nested-PCR: (PCR-Produkt = 152bp)

sense 5'-ACTCCAGGGAAGCATGGTTGG-3' $T_m = 66^\circ\text{C}$

antisense: 5'-GGATGTTTCCTTCACTGCAGTTC-3' $T_m = 66^\circ\text{C}$

Primer für die GAPDH-PCR: (PCR-Produkt = 298bp)

sense: 5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3' $T_m = 62^\circ\text{C}$

antisense: 5'-GCCGGTAGTGCGGTGTCAAA-3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

b) Primer für die Klonierung der Rezeptormutanten:

Alk-sense: 5'-TAAGAAGCTTGATGGGAGCCATGGGGC-3' **HindIII**

$T_m = 58^\circ\text{C}$

Alk-L-antisense: 5'-AGTTCTAGATTATGACACAATGCAGGAGACG-3' **XbaI**

$T_m = 58^\circ\text{C}$

Alk-M-antisense: 5'-AGTTCTAGATTATATGGCTTGCAGCTCCTGG-3' **XbaI**

$T_m = 58^\circ\text{C}$

Alk-L-Produkt = 3094bp Alk-M-Produkt = 3229bp

c) Primer für die Klonierung der Ligandenbindedomäne von ALK:

Alk_{LBD}-sense: 5'-CATGCCATGGGATATGGTCTGGAGTGCAG-3' **NcoI**

$T_m = 58^\circ\text{C}$

Alk_{LBD}-antisense: 5'-CCGCTCGAGCACAGTCCTGGTGGAAG-3' **XhoI**

$T_m = 58^\circ\text{C}$

Alk-LBD-Produkt = 603bp

d) Real-Time-PCR-Primer:

Primer	Sequenz	T_m	Produkt
PtnRT-se:	5' - AACTGACCAAGCCCAAACCT -3'	60°C	91bp
PtnRT-as:	5' - GGTGACATCTTTTAATCCAGCA -3'	59°C	
AlkRT-se:	5' - CACACTGTCACCCCACACTC -3'	60°C	98bp
AlkRT-as:	5' - CAGTGGTACTGAGCAATAGAGCA -3'	59°C	
GAPDH-se:	5' - AGCCACATCGCTGAGACAC -3'	60°C	66bp
GAPDH-as:	5' - GCCCAATACGACCAAATCC -3'	60°C	
Alk55-se:	5' - AAGACAGGCCCAACTTTGC -3'	60°C	70bp
Alk55-as:	5' - TTGATTACATCCGGGTCCTG -3'	60°C	
Alk81-se:	5' -CACTCCAGGGAAGCATGG -3'	60°C	105bp
Alk81-as:	5' - AAGCTGCGGTTTCCACTG -3'	59°C	
Actin-se:	5' - CCAACCGCGAGAAGATGA -3'	60°C	97bp
Actin-as:	5' - CCAGAGGCGTACAGGGATAG -3'	59°C	
HPRT-se:	5' - TGACCTTGATTTATTTTGCATACC -3'	59°C	102bp
HPRT-as:	5' - CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT -3'	60°C	
PTPRZ1-se:	5' - CTAAAGCGTTTCCTCGCTTG -3'	60°C	69bp
PTPRZ1-as:	5' - GTAGTATCCATTAGCCCAATCCA -3'	59°C	
Midkine-se:	5' - ACCAAAGCAAAGGCCAAAG -3'	60°C	136bp
Midkine-as:	5' - ACTGGTGGGTCACATCTCG -3'	59°C	

Sonden:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 verschiedene radioaktiv markierte (³²P) Sonden benutzt. Dabei handelt es sich bei PTN und 18S um cDNA-Sonden („full length“-Sonden) und bei ALK um eine Primer-Sonde. Die Aufstellung der Primer-Sonden

erfolgte nach denselben Kriterien wie die der Primer. Die komplementäre Sequenz liegt innerhalb des jeweiligen Gens zwischen den in der PCR verwendeten Primern. Sie wurden wie diese von MWG-Biotech AG synthetisiert und im Labor mit sterilem Wasser gelöst und ebenfalls auf eine Konzentration von 100 pmol/μl gebracht.

ALK-Sonde: 5'- ACTCCAGGGAAGCATGGTTGG -3'

siRNA:

PTN-siRNA: (PTN-473 von Ambion)

siRNA-Duplex:

5'- GUGAAGAAGUCUGACUGUGtt -3'

3'- ttCACUUCUUCAGACUGACAC -5'

Ziel-Sequenz:

5'- AAGTGAAGAAGTCTGACTGTG -3'

LUC-siRNA: (pGL2 von Dharmacon)

siRNA-Duplex:

5'- CGUACGCGGAUACUUCGAtt -3'

3'- ttGCAUGCGCCUUAUGAAGCU -5'

Ziel-Sequenz:

5'- CGTACGCGGAATACTTCGA -3'

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Allgemeine Methoden zur Kultivierung der Zellen

Kultivierung:

Die Zellen wurden in einer mittleren Kulturflasche à 75cm² Fläche mit 10 ml IMDM-Medium + 10%FCS bei 37°C in einer 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert, bis sie ein Stadium von 80-90% Konfluenz erreicht hatten. Um die Zellen auch weiterhin bei optimalen Bedingungen zu erhalten, wurden sie zu diesem Zeitpunkt passagiert. Vor bestimmten Wachstumsassays wurden die Zellen drei bis vier Tage auf serumfreien oder serumarmen Medium kultiviert, da sich unter diesen Bedingungen besser die Unterschiede in der Wachstumskinetik verschiedener gentechnisch veränderter Subpopulationen manifestiert haben.

Passagierung:

Das Medium wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgezogen. Danach wurden Medienreste und lose Zellen durch Waschen mit 5 ml sterilem PBS entfernt. Die Zellen wurden anschließend vom Flaschenboden durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37°C für 2-5 min abgelöst. Die Reaktion des Enzyms musste durch Zugabe von 8 ml IMDM-Medium mit 10% FCS gestoppt werden.

Für die weitere Kultivierung wurden nun je nach erforderlicher Zelldichte 500µl bis 5ml dieser Suspension in eine neue Kulturflasche eingesät und mit Medium auf 10ml aufgefüllt.

Sollten die Zellen für einen Versuch verwendet werden, war das Einsäen einer genau definierten Zellzahl notwendig. Diese wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

Ermittlung der Zellanzahl:

Die Zählkammer (Neubauer) und das geschliffene Deckglas mussten gut geputzt sein. Durch leichtes Schieben wurde das Deckglas so auf die Zählkammer aufgedrückt, dass Newton'sche Ringe sichtbar wurden. Nur so konnte das für die Berechnung genutzte

Volumen garantiert erreicht werden. Mit einer Pipette, die zuvor in die Zellsuspension getaucht wurde, wurde die Zählkammer befüllt.

Es wurden 4 Großquadrate mit einer Kantenlänge von je 1 mm ausgezählt. Das macht eine Gesamtfläche von 4 mm². Der Abstand zwischen geschliffenem Deckglas und Zählnetz beträgt 0,1 mm, so dass in einem Volumen von 0,4 µl ausgezählt wurde. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten, musste deshalb folgende Formel angewendet werden:

$\text{Zellzahl / ml} = \text{gezählte Zellen} * 10000 / 4$

Der Faktor 10000 kommt zustande durch die Umrechnung des Volumens von 0,1 µl auf 1 ml. Durch 4 wird geteilt, da man nicht 0,1 µl sondern 0,4 µl ausgezählt hat.

Einfrieren der Zellen:

Wurden die Zellen nicht für weitere Experimente benutzt, konnten sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und die Reaktion durch Zugabe von Medium abgestoppt. Die Suspensionen wurden in 15 ml Falconröhrchen für 10 min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und je nach Größe des Pellets wurden 1, 2 oder 3 ml Einfriermedium dazu pipettiert und die Zellen darin resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Aliquotierung zu je 1 ml in Einfrierröhrchen.

<u>Einfriermedium</u>	IMDM-Zellkulturmedium
	20% FCS
	5% DMSO

In einem mit Isopropanol gefüllten Kunststoffgefäß wurden die Zellen langsam auf -80°C gekühlt und darin mindestens zwei Tage belassen. Die Dauerlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.1.2 Transfektion

Stabile Transfektion mit DNA-Konstrukten

Für die Untersuchung des Einflusses von PTN und ALK auf das Wachstum verschiedener Tumorarten sowie für die Herstellung PTN und ALK überexprimierender Zelllinien wurden stabile Zelllinien generiert. Für sämtliche Transfektionen wurde Plasmid-DNA verwendet, die (mit Hilfe eines Macherey&Nagel-Kits) aus zuvor transformierten E.coli Bakterien isoliert wurde (siehe DNA-Präparation 3.2.4). Die Ribozyme gegen PTN und gegen ALK, sowie die ALK-Verkürzungsmutanten ALK-L und ALK-M wurden zuvor in den pRc/CMV-Vektor kloniert. Dieses Plasmid verfügt neben dem Polylinker und den für die Replikation in E.coli nötigen Sequenzen über ein G418-Resistenzgen (Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase), das eine spätere Selektionierung erlaubt. Bei den Einzeltransfektionen wurden die Zelllinien ausschließlich mit diesem Vektor transfiziert. Die mit einem Ribozym (im pRc/CMV-Vektor) stabil transfizierten Zelllinien wurden zum Zwecke der Doppeltargeting-Studie mit dem jeweils fehlendem Ribozym (ebenfalls im pRc/CMV-Vektor) und einem zweiten Vektor (pcDNA-Hygro⁺ oder pBabe-Puro) kotransfiziert. Der zweite Vektor wurde im zehnfachen Unterschuss eingesetzt und diente der Selektion mit einem zweiten Antibiotikum. Für die Einschleusung in die humanen Tumorzellen wurde ein positiv geladenes, chemisches Transfektionsreagenz (Polyethylenimin-JetPEI) benutzt, das die DNA stabilisiert und vor dem Verdau schützt.

Für die Transfektion adhärenter Zellen wurden 100000 Zellen pro Well im 6-Well Gefäß eingesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Bei der Transfektion „in Suspension“ hingegen wurden 100000 Zellen gleichzeitig mit dem DNA/PEI-Komplex in die Gefäße pipettiert. Für die Transfektion eines Wells in einer 6-Well-Platte wurden 3µg der Plasmid-DNA in 50 µl sterilem NaCl pH 7,3 gelöst. Parallel wurden 6µl JetPEI auf 50 µl mit NaCl verdünnt. Nach 5min Prä-Inkubation wurde die JetPEI-Lösung zur DNA-Lösung dazupipettiert und kräftig gevortext. Die Komplexbildung erfolgte während einer 45min andauernden Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden die Komplexe auf die mit frischem Medium versorgten Zellen pipettiert und für 5 Stunden belassen. Nach abgeschlossener Transfektion erfolgte nochmals ein Mediumwechsel um toxische Effekte von PEI zu vermeiden.

Selektionierung von transfizierten Zellen:

Das Vorhandensein von Resistenzgenen gegenüber toxischen Agenzien auf den bei der Transfektion benutzten Vektoren ermöglicht es, transfizierte Zellen zu selektionieren. Kodiert das Plasmid für keine Resistenz, oder versucht man ein zweites Konstrukt im gleichen Vektor in die Zelle einzuschleusen, so kann bei der sog. Ko-Transfektion ein zweites Plasmid mit einer anderen Resistenz im zehnfachen Unterschuss zugesetzt werden. Der Einbau des unterschüssigen Plasmids garantiert mit hoher Sicherheit auch den Einbau des anderen Plasmids.

Die Selektionierung begann stets 48h nach abgeschlossener Transfektion und beruhte auf dem Zusatz von Antibiotika zum Nährmedium der Zellen. Um die wirksame Konzentration des Antibiotikums für die jeweilige Zelllinie zu ermitteln mussten Eichreihen durchgeführt werden.

Die bei der Selektionierung eingesetzten Konzentrationen waren wie folgt:

	U87MG u. T98G	LOVO	NCCIT
G418	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml
Puromycin	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
Hygromycin	400 µg/ml	400 µg/ml	400 µg/ml

Der Vorgang wurde mindestens zwei Wochen fortgeführt, bis kein Absterben der Zellen mehr sichtbar war. Die stabil transfizierten Zelllinien wurden dann vermehrt, in Form von Cryo-Stocks eingefroren oder für weitere Experimente verwendet.

Transiente Transfektion:

Als Ansatz zur funktionellen Analyse *in vitro* bzw. zur Erforschung potentieller Gentherapie in Nacktmäusen wurden humane Tumorzelllinien transient mit siRNA gegen den Wachstumsfaktor Pleiotrophin transfiziert. Ähnlich wie bei der stabilen Transfektion „in Suspension“ wurden 100000 Zellen zusammen mit siRNA/PEI-Komplexen in die Wells eingesät. Pro Well im 6-Well wurden 30 pmol PTN- oder Luc-siRNA (Kontrolle) eingesetzt, was 0,4 µg siRNA entspricht. Diese wurden folgendermaßen komplexiert:

- 1) 0,4 µg siRNA wurden in 50 µl sterilem HEPES/NaCl-Puffer gelöst
- 2) 1,6 µl JetPEI (oder 8,96 µl F25-PEI) wurde auf 50µl mit HEPES/NaCl-Puffer aufgefüllt
- 3) Das JetPEI/Puffer-Gemisch wurde zur siRNA/Puffer-Lösung pipettiert, gevortext und 45min bei RT inkubiert
- 4) 100µl Komplex wurden zusammen mit 100000 Zellen in das Well pipettiert

Nach fünf Stunden wurden die transfizierten Zellen passagiert um später im Proliferationsassay und Soft-Agar-Assay untersucht werden zu können.

3.1.3 Proliferationsassay

Mit Hilfe eines Proliferationsassays kann der Einfluss einer Substanz bzw. eines anderweitigen Eingriffs in die Zelle auf ihre Wachstumseigenschaften untersucht werden. Als Reagenz zur Bestimmung der Zahl der lebenden Zellen diente das Cell Proliferation Reagent WST-1 der Firma Roche Mannheim. Lebende Zellen setzten enthaltenes Tetrazoliumsalz (WST-1: 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) zum entsprechenden Formazan um. Durch einen Farbumschlag von rot nach gelb wird diese Reaktion sichtbar. Mittels spektrophotometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm wird der Test quantitativ im ELISA-Plattenlesegerät ausgewertet. Aufeinanderfolgende Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten führen zur Erstellung einer Wachstumskurve. Da das Tetrazoliumsalz von zelleigenen Enzymen gespalten wird, ist die Inkubationsdauer mit dem Reagenz abhängig von der verwendeten Zelllinie und muss vor den eigentlichen Messungen ermittelt worden sein. Der Hersteller gibt an, dass die Inkubationsdauer zwischen 0,5 und 4 Stunden liegen sollte. Für die meisten hier getesteten Zelllinien galt eine Inkubationsperiode von 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂.

Durchführung:

Die Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben trypsiniert, gezählt und auf eine Zelldichte von 2500 oder 5000 Z/ml eingestellt. 200 µl der Zellsuspensionen wurden zu gleichen Teilen in eine 96-Well Platte pipettiert, was eine Zellzahl von 500 oder 1000

Zellen pro Well ergab. Darauf folgte eine Inkubation im Brutschrank bis die Zellen gut angeheftet waren (meist über Nacht).

Zu jedem Messzeitpunkt wurde das WST-1-Reagenz in dem verwendeten Medium im Verhältnis 1:10 verdünnt und mit 50 µl pro Well pipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 1h bei 37°C und 5% CO₂. Für die Messung des Hintergrunds wurde zu jedem Zeitpunkt ein leeres Well mit 50µl des WST-Gemisches befüllt. Die photometrische Messung mit dem ELISA Reader (Elx800) erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Bei den Einzel- und Doppeltargeting-Studien befanden sich verschiedene stabil-transfizierte Zelllinien in den Platten. Als Referenzwert diente jeweils die nur mit dem Leervektor-transfizierte Zelllinie. Bei PTN-Stimulationsassays wurde dem Medium noch zusätzlich rekombinantes PTN in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und anschließend wurde das Wachstum von stimulierten und unstimulierten Zellen verglichen.

Anmerkungen:

Bei den 96-Well Platten wurde in die äußeren Wells keine Zellsuspension pipettiert, da in vorangegangenen Experimenten des Autors festgestellt wurde, dass die aus diesen Wells ermittelten Ergebnisse stark von denen aus den inneren Wells erhaltenen abwichen. Aus diesem Grunde wurden die äußeren Wells lediglich mit 200 µl sterilem PBS befüllt.

Die Inkubationszeiten mit dem Messreagenz müssen innerhalb einer Wachstumskurve zu jedem Zeitpunkt identisch sein (vor allem auch zwischen mehreren Platten), da nur so miteinander vergleichbare Ergebnisse ermittelt wurden.

Zu einem Zeitpunkt wurden 4 bis 10 Wells gemessen plus das leere Well (Leerwert). Vom ELISA Reader wurde dann die Absorption des als Leerwert dienenden Wells vom Messwert der anderen Wells abgezogen.

3.1.4 Weichagarassay

Der Weichagarassay ist der *in vivo*-Situation angenähert, da die Zellen in einer agarhaltigen Matrix eingebettet werden und nicht wie bei der normalen Kultivierung adhärent auf dem Boden einer Kulturflasche wachsen. Dies ermöglicht den Zellen

dreidimensionales Wachstum und erlaubt tumorigenen Zelllinien (wie z.B. U87MG, Lovo, NCCIT) die Kolonienbildung. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Kolonienbildung kann dann nach 1-4 Wochen analysiert werden.

Vorbereitung:

Mindestens einen Tag vor der Durchführung musste der Agar vorbereitet werden. Dazu wurde eine 2,4% Agaroselösung hergestellt (Agarose + monodestilliertes Wasser) und anschließend autoklaviert.

In einer Sterilbank der Zellkultur wurde ein Wasserbad aufgebaut und auf 42°C geheizt. In dieses Wasserbad wurde eine leere autoklavierte Flasche gestellt, mit 1,25 ml 10x IMDM-Medium und 37,5 ml 1x IMDM-Medium + 10% FCS befüllt und auf 42°C vorgewärmt. Währenddessen konnte die Agarose in der Mikrowelle so lange aufgekocht werden, bis keine Klümpchen mehr sichtbar waren. Im Wasserbad kühlte der Agar für ca. 10 min ab, so dass er eine Temperatur von $\approx 50^{\circ}\text{C}$ hatte. Das vorbereitete Mediengemisch wurde nun zum Agar gegossen und gut durchmischt.

Bodenagar gießen:

In eine 6-Well Platte wurde pro Well 1 ml Agargemisch (0,6% Bottom-Layer) luftblasenfrei gegossen und in der Sterilbank so lange stehen gelassen, bis es ausgehärtet war.

Zellen vorbereiten:

Während des Aushärtens des Bodenagars wurden die Zellen wie unter 3.1.1 trypsiniert, gezählt und mit IMDM-Medium + 10% FCS auf eine Konzentration von $6 \cdot 10^4$ / ml gebracht (die Suspension durfte auf keinen Fall Zellaggregate enthalten).

Top-Agar gießen:

Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden mit 1 ml / Well (60000 Zellen) in einer 12-Well Platte vorgelegt. Dazu wurden 1,5 ml Bottom-Agar dazupipettiert und zügig vermischt. Die so erhaltenen 2,5 ml Agar-Zellsuspension wurden umgehend mit je 800 μl auf 3 Wells der 6-Well Platte verteilt. Es entstand so eine 0,36% Agar-Endkonzentration des zellhaltigen Top-Agars. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 1,8

ml und in jedem Well lag eine Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ vor. Pro Konstrukt bzw. Stimulationstypus gab es mindestens ein Well-Triplikat.

Stimulation:

Im Falle der Stimulation mit PTN wurden 60000 Zellen in 0,8 ml (statt 1,0 ml) vorgelegt und 200 μ l der Stimulationslösung (PTN) bzw. einer entsprechenden Negativkontrolle zugesetzt (z.B. 0,01 M Natriumphosphat-Puffer). Die jeweilige PTN-Menge ist bei der Auswertung im Ergebnisteil vermerkt.

Inkubation und Auswertung:

Die Platten wurden 7 bis 28 Tage bei 37°C und mit 5% angereicherter CO₂-Atmosphäre inkubiert. Mit der Auswertung wurde begonnen, sobald die Kolonien eine bestimmte Größe erreicht haben. Dazu wurde ein Durchlichtmikroskop mit geeigneter Vergrößerung (125x und 50x) sowie ein Okular mit eingraviertem Zählraster verwendet. Es wurde eine Zählgrenze („cut off“) mit Hilfe des Rasters festgelegt, ab der alle Kolonien in die Statistik aufgenommen wurden. Die Auswertung erfolgte durch mehrere Personen, die über den experimentellen Hintergrund nicht informiert waren.

3.1.5 Wounding-Assay

Um die Auswirkungen der PTN-Herunterregulierung auf die Zellmotilität zu untersuchen, wurden stabil Ribozym-transfizierte U87- und T98G-Zelllinien in 6-Well-Platten eingesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert (mindestens in Triplikaten pro Konstrukt). Daraufhin wurden mit sterilen Pipettenspitzen x-förmige Schneisen von definierter Breite in den Monolayer geritzt. Um Zelltrümmer und lose Zellen zu entfernen wurde das Kulturmedium (10% FCS) mit frischem, serumreduzierten Medium ersetzt (2% FCS). Während der darauffolgenden Versuchsphase wurden Unterschiede im erneuten Verschließen der Schneise mikroskopisch mit Hilfe eines Zähllokulars verfolgt. Die dadurch ermittelte prozentuale Konfluenz innerhalb der Schneise (vermittelt durch Wiederbesetzung der Lücke mit Zellen) wurde grafisch in Form einer Wachstumskurve aufgetragen. Parallel zur Messung wurden die einzelnen Stadien des Wiederverschließens fotografisch dokumentiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation

Die Transformation wurde durchgeführt um Plasmid-DNA, die bestimmte Konstrukte enthielt von kompetenten E.coli Bakterien aufnehmen zu lassen. Zu Beginn wurden für alle Transfektionsansätze sterile Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) auf Eis gestellt. Es empfiehlt sich, mehrere Ansätze mit verschiedenen DNA-Konzentrationen und einen Kontrollansatz ohne Plasmid-DNA vorzubereiten. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach leichtem Durchmischen wurden 50 µl der Zellen in jedes Eppendorf-Gefäß gegeben. 1-3 µl Plasmid-DNA (1-10 ng) wurden direkt zu den 50 µl pipettiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 2 min in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten und anschließend sofort wieder für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium (RT) wurden die Ansätze für 20 min bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion der E.coli Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, wurden von den verschiedenen Ansätzen und von der Negativkontrolle 950 µl und 50 µl auf je eine LB-Amp-Platte ausgestrichen. Die Konzentration von Ampicillin im LB-Agar betrug 1000 ng/ml. Zum Ausstreichen wurde ein Drigalski-Spatel benutzt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch Ampicillin. Bakterien, die kein Plasmid, auf dem eine Ampicillin-Resistenz kodiert, aufgenommen haben, wuchsen auf den LB-Ampicillin- Platten nicht.

3.2.2 Restriktionsanalyse

Die Restriktion mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.7.1) ist ein Verfahren, das eine Analyse der klonierten Fragmente ermöglicht. Die Restriktion erfolgte in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml). Dazu wurden 0,5 µg der zu untersuchenden Plasmid-DNA mit 2 µl des passenden Restriktase-Puffers (10x konz.) und je 1-2 µl (5-10U) von den entsprechenden Restriktionsenzymen auf 20 µl mit H₂O bidest aufgefüllt. Danach erfolgte der Restriktionsverdau bei 37°C für 1-2h abhängig vom eingesetzten Enzym. Das gesamte Reaktionsvolumen wurde anschließend auf das Agarosegel geladen und der elektrophoretischen Auftrennung unterzogen.

3.2.3 Klonierung verschiedener ALK-Konstrukte

Sämtliche Klonierungen von PCR-Produkten wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

- a) PCR – Reaktion mit jeweiligen Primerpaaren
 - b) Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel
 - c) Elution der spezifisch amplifizierten DNA aus dem Gel
 - d) Phenol/Chlorophorm Extraktion der PCR – Produkte
 - e) Restriktion des Vektors und des PCR – Produkts (Insert)
 - f) Dephosphorylierung des Vektors
 - g) Ligation
 - h) Transformation und Ausplattieren
 - i) Kultivierung im flüssigen LB-Amp – Medium
 - j) DNA – Reinigung
 - k) Sequenzierung
-
- a) Für die PCR-Reaktion wurde als Matrize der pDs-Alk-H-Vektor benutzt, der das vollständige humane ALK-Gen enthält. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Aigner zur Verfügung gestellt. Die jeweils benutzten Primerpaare sind im Materialteil aufgelistet. Die PCR-Reaktionen wurden wie unter 1.2.9 beschrieben durchgeführt. Für die Klonierungs-PCRs wurde jedoch eine High-Fidelity-Polymerase von Roche benutzt.
 - b) Um die gewünschten PCR-Produkte von unspezifischen Nebenprodukten zu trennen wurden diese einer elektrophoretischen Trennung in einem 0,7%-igen Agarosegel unterzogen (siehe 1.2.7.1).
 - c) Die gewünschten Banden wurden unter UV-Beleuchtung aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde mittels der Ultrazentrifugation in einem perforierten Eppendorf-Gefäß aus dem Gel wiedergewonnen. Dazu wurde das Eppendorf-Gefäß am Boden kreuzweise mit einem scharfen Skalpell angeschnitten um ein Austreten der Flüssigkeit zu ermöglichen. Anschließend

- wurde das so präparierte Gefäß mit der Gelbande beladen, in einem größeren Auffanggefäß platziert und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dabei gelangte die im TBST-Puffer enthaltene DNA ohne Agarose in das Auffanggefäß und konnte sofort weiterbenutzt werden.
- d) Die eluierten DNA-Fragmente wurden dann einer Phenol/Chlofoform-Extraktion unterzogen um sie auf die Restriktion vorzubereiten. Zu diesem Zweck wurde zur DNA-Lösung gleiches Volumen des Phenol/Chloroform-Gemisches dazugegeben, geschüttelt und fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, DNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und dort mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol gemischt um Phenolreste zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurde die obere Phase erneut in neue Gefäße überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe des 2 bis 2,5-fachen Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3M Kaliumacetat (pH 5,0). Es folgten 5 min Inkubation bei RT und eine anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 Minuten. Das so entstandene DNA-Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Sediment luftgetrocknet und anschließend in sterilem, bidestillierten Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration sowie die Reinheit der DNA photometrisch ermittelt.
- e) Vor der Ligation wurden die DNA-Inserts und Vektoren mit entsprechenden Endonukleasen wie in 3.2.2 beschrieben restringiert.
- f) Nach der Restriktion der zu ligierenden DNA-Fragmente, wurden die 5'-endständigen Phosphatgruppen des Vektors mit einer Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase) entfernt. Dazu wurden 2U der SAP-Phosphatase mit 4µl SAP-Puffer und 35µl sterilem *Aqua bidest.* vermischt. Das Gemisch wurde zu der restringierten Vektorlösung (20µl) dazupipettiert, 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend bei 65°C inaktiviert, um eine unspezifische Entfernung innenliegender Phosphatgruppen zu verhindern.
- g) Die Ligrationsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10µl bestehend aus: 2 µl Vektor, 5µl Insert (in einem molaren Verhältnis von 1:5), 1µl 10x

Ligasepuffer und 2µl Ligase (3U) durchgeführt. Die Reaktion dauerte 4 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16°C.

- h) Die Transformation und das Ausplattieren wurden wie im Punkt 1.2.1 beschrieben durchgeführt.
- i) Die positiven Klone, die keine Satellitenkolonien aufwiesen und gut getrennt von anderen Kolonien wuchsen, wurden auf flüssiges LB-Amp-Medium (100 µg Ampicillin auf 1 ml Medium) angeimpft und bei 240 rpm und 37°C über Nacht kultiviert. Für spätere Versuche wurden anschließend Glycerin-Stocks hergestellt (1 ml Bakteriensuspension + 0,5 ml Glycerin).
- j) Für anstehende Sequenzierungen sowie spätere Transfektionen von Säugerzellen wurde die aus den positiven Klonen stammende Plasmid-DNA Klone mit Hilfe eines Nucleobond-Kits von der Firma Macherey&Nagel gereinigt (siehe 1.2.4).
- k) Die Sequenzierung wurde bei der Firma MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt.

Klonierung und Sequenzierung der verkürzten Rezeptorvarianten:

Die Herstellung der ALK-Verkürzungsmutanten erfolgte mittels der PCR auf Basis eines ALK-Expressionsplasmids als Matrize. Der Hin-Primer (ALK-H-hin) wurde so gewählt, dass der N-Terminus des ALK-Rezeptors den Anfang der zu klonierenden Sequenz bildete und am C-Terminus wurden zwei verschiedene Primer eingesetzt (ALK-H-L-rev und ALK-H-TM-rev), die jeweils vor bzw. hinter der Transmembran-Domäne binden. Damit wurden zwei verkürzte Rezeptorsequenzen amplifiziert, die ALK-M-Sequenz ohne intrazelluläre Domäne (3229 bp) und die ALK-L-Sequenz ohne intrazelluläre und Transmembran-Domäne (3094 bp). Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, analysiert und bei der Klonierung eingesetzt. Als Expressionsvektor für die Verkürzungsmutanten wurde pRc/CMV gewählt. Sowohl die Inserts wie auch der Leervektor wurden mit HindIII und XbaI verdaut und anschließend mit T4-Ligase ligiert. Nach erfolgter Transformation wurde die Plasmid-DNA der positiven Klone gereinigt und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung bestätigte die Richtigkeit der Amplifizierung und die korrekte Klonierung, sodass die Expressionsvektoren für die Transfektion diverser Tumorzelllinien eingesetzt werden konnte.

3.2.4 DNA-Präparation

Die Plasmid-DNA - Reinigung erfolgte mit Hilfe eines Nucleobond-Kits von der Firma Macherey&Nagel. Die transformierten E.coli Bakterien wurden in 200ml ampicillinhaltigen LB-Medium (1000ng/ml) über Nacht kultiviert und anschließend bei 5000g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dann laut Kit-Vorschrift in folgenden Schritten weiterbehandelt:

- 1) Zellaufschluss
- 2) Präzipitation der chromosomalen DNA
- 3) Klärung des Lysats
- 4) Äquilibration der Säule
- 5) Adsorption
- 6) Waschen
- 7) Elution
- 8) Präzipitation der Plasmid-DNA

Anschließend wurde die gereinigte DNA in 100 ml sterilem, bidestillierten Wasser resuspendiert und einer Konzentrationsmessung unterzogen.

3.2.5 RNA-Präparation

Ubiquitär vorhandene RNasen können RNA zerstören. Zum Schutz der RNA wurde aus diesem Grund immer mit neuen Einwegmaterialien gearbeitet und Handschuhe sowie Arbeitsplatz und Schlitten der Elektrophoresekammer wurden vor Beginn der Tätigkeit mit RNase Erase™ Spray behandelt. Bei allen Reagenzien, die mit Wasser verdünnt bzw. angesetzt wurden, wurde bidestilliertes, mit DEPC behandeltes, autoklaviertes Wasser verwendet.

Die RNA-Präparation erfolgte mit einem Kit von Peqlab, Erlangen. Zur Lyse der Zellen wurden pro Zellkulturflasche 1ml Tri-Fast Reagenz pipettiert und kurz inkubiert (wegen der Phenoldämpfe erfolgte dieser Schritt unter dem Abzug). Die in peqGOLD TriFast™ lysierten Zellen konnten bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Der weitere Vorgang entsprach der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Die extrahierte RNA wurde schließlich in einem entsprechenden Volumen (meist 20 µl) bidestilliertem, mit DEPC behandeltem, autoklaviertem Wasser aufgenommen.

3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Gemessen wurde mit einer Quarzglasküvette gegen steriles, bidestilliertes Wasser als Nullwert. Mit dem ist Aus der gemessenen Absorption wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die DNA bzw. RNA-Konzentration berechnet. Die Reinheit der DNA oder RNA wurde durch den Quotienten aus A_{260} und A_{280} bestimmt. Der optimale Bereich befindet sich zwischen 1,7 und 2,0.

$$A = \varepsilon * C * d$$

A = Absorption bei 260 nm

ε = Absorptionskoeffizient ($\varepsilon = 50$ für DNA und $\varepsilon = 40$ für RNA)

C = Konzentration

d = Schichtdicke der Quarzglasküvette

3.2.7 Agarosegelelektrophorese

Infolge der negativen Ladung der Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat Rückgrats der Nukleinsäuren ist eine Auftrennung von Nukleinsäuren nach der Größe im elektrischen Feld möglich. Als Trägermaterial dient Agarose, ein Polymer aus verschiedenen verknüpften Galactoseeinheiten. Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenantridiniumbromid), ein organischer Farbstoff, wird dem Agarosegel beigemischt und dient der Anfärbung der Nukleinsäuren. Er interkaliert in die doppelsträngige DNA und interagiert mit einzelsträngigen Nukleinsäuren. UV-Licht regt diesen Farbstoff zur Lichtemission im sichtbaren Bereich an.

Nicht reduzierendes Agarosegel für die Auftrennung von DNA:

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen diente die Agarose-Gelelektrophorese der DNA der Restriktionsanalyse, der Kontrolle der PCR und als Vorbereitung des Southern Blots.

Es wurden Agarosegele in einer Konzentration zwischen 0,7 und 2% zur Auftrennung der DNA benutzt. Dabei wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Laufpuffer) aufgekocht. Nachdem das Agarosegemisch auf eine Temperatur von 55-

60°C abgekühlt war, wurde das Ethidiumbromid zugegeben (2 µl einer 10 mg/ml Stammlösung auf 100 ml Agarose) und nach guter Durchmischung das Gel gegossen.

<u>10x TAE Puffer:</u>	400 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) 20 mM Essigsäure 20 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,0
------------------------	--

Nachdem das Gel im Schlitten erstarrt war, wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TAE Puffer (hergestellt durch verdünnen des 10x Puffers mit monodestilliertem Wasser) überschichtet.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit 10% des Endvolumens eines 10x DNA-Probenaufragspuffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Das im DNA-Auftragspuffer enthaltene Glycerin erhöht die Dichte der Lösung und führt zum Absacken der Lösung in die Geltaschen. Dadurch wird die Diffusion der DNA in den Laufpuffer verhindert. Die beiden anderen Bestandteile sind lediglich Farbstoffe, die einen Anhaltspunkt für den Lauf der DNA bieten.

<u>10x DNA-Probenaufragspuffer:</u>	30% Glycerin 0,05% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
-------------------------------------	---

Die DNA lief 10 min bei 40 V in das Gel ein. Danach wurde die Spannung auf 80 V erhöht. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht betrachtet und zu Dokumentationszwecken mit dem Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 digital fotografiert.

Reduzierendes Agarosegel für die Auftrennung von RNA:

Zur Auftrennung aus Zellen extrahierter RNA wurde ein 1% reduzierendes Agarosegel verwendet. Wegen der Toxizität des Formaldehyds erfolgte das Giessen des Gels unter dem Abzug, nachdem sowohl Schlitten der Elektrophoresekammer als auch zugehörige Kämme gereinigt und mit RNase Erase™ Spray behandelt worden waren.

200 ml reduzierendes Agarosegel:

2 g Agarose wurde in 175 ml DEPC behandeltem, autoklaviertem Wasser durch Kochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nachdem die Agarose auf 55-60°C abgekühlt war, wurden 5 ml 37% Formaldehyd, 20 ml 10x MOPS Laufpuffer, 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) dazupipettiert und die Mischung in einen großen Gelschlitten eingefüllt. Das erstarrte Gel wurde samt Gelschlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x MOPS-Laufpuffer überschichtet.

<u>10x MOPS Laufpuffer:</u>	83,72 g MOPS (3-Morpholino-1-propansulfonsäure) 13,61 g Natriumacetat * 3H ₂ O 3,72 g EDTA ad 1 l mit DEPC Wasser
-----------------------------	---

Als Proben diente die aus den jeweiligen Zellen extrahierte RNA. Während das Gel erstarrte wurden die Proben vorbereitet. Die in 10 µl DEPC behandeltem, autoklaviertem Wasser gelöste RNA wurde mit 20-25 µl RNA-Ladepuffer versetzt und für 10-15 min bei 65°C denaturiert.

<u>RNA-Ladepuffer:</u>	500 µl Formamid 125 µl 37% Formaldehyd 50 µl 10x MOPS 50 µl loading dye
<u>loading dye:</u>	1 mM EDTA pH 8,0 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 50% Glycerin

Anschließend wurde das gesamte Probenvolumen in eine Tasche des Agarosegels pipettiert und eine Spannung von 80 V angelegt. Nach zwei Stunden war die RNA gut aufgetrennt und sowohl die 18S als auch die 28S Bande waren im UV-Licht sichtbar. Zu Dokumentationszwecken wurde das Bild mit dem Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 digital fotografiert.

3.2.8 Northern Blot

Zum spezifischen Nachweis von PTN-RNA in der aus den Zellen extrahierten RNA wurde das Northern Blot-Verfahren benutzt. Dabei wird die zuvor in einem reduzierenden Agarosegel aufgetrennte RNA mittels des Kapillarblots auf eine Nylonmembran (Hybond™-N Membran) übertragen. Während des anschließenden Backens bei 80°C für 2 h wird die RNA immobilisiert. Nach dem Blockieren (Prähybridisieren) der unspezifischen Bindungsstellen mit Lachssperma erfolgt die Hybridisierung mit der spezifischen radioaktiv markierten Sonde. Durch anschließende Waschschrte werden nicht oder nur schwach gebundene radioaktive Nukleotide von der Oberfläche abgelöst. Die Visualisierung der gebundenen Sonde erfolgt durch Filmexposition oder Phosphorimaging. Die Nutzung eines Phosphorimagers gestattet eine objektive quantitative Auswertung.

Northern Blot Gel:

Das Agarosegel wurde wie unter 3.2.7.2 beschrieben angefertigt und zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Proben verwendet.

Transfer auf die Membran:

Für den Transfer der RNA wurde eine Plastikwanne mit 20x SSC-Puffer befüllt und mit einer mit feuchtem Whatmanpapier-Brücke belegten Glasplatte bedeckt. Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen nach unten auf die Whatmanpapier-Brücke gelegt, mit 20x SSC-Puffer befeuchtet und mit einer Nylonmembran bedeckt. Anschließend wurden drei Schichten Whatmanpapier sowie ein saugfähiger Papierstapel aufgelegt und beschwert.

Als Transferpuffer diente 20x SSC (Saline with Sodium Citrat).

<u>20x SSC:</u>	3 M NaCl 300 mM Na ₃ Citrat * H ₂ O 0,1% DEPC pH 7,0 mit NaOH eingestellt
-----------------	--

Der Transfer erfolgte über Nacht.

Am nächsten Morgen wurde die Apparatur abgebaut und die Membran mit dem Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 digital fotografiert.

Backen:

Zum Backen wurde die Membran auf Whatmanpapier gelegt und 2 Stunden bei 80°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Prähybridisierung:

Daraufhin wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre gelegt und rotierte für mindestens 2 Stunden mit Prähybridisierungslösung bei 42°C.

<u>Prähybridisierungslösung:</u>	50% Formamid 25% 20x SSC 10% 50x Denhard's Lösung 0,1% 10% SDS ad 100% mit DEPC Wasser auffüllen direkt vor der Prähybridisierung wurde Lachsspermien-DNA auf 100°C erhitzt und zugegeben (100 µl bei 10 ml Gesamtvolumen)
<u>50x Denhard's Lösung:</u>	2% Ficoll 40 2% Polyvinylpyrrolidon 2% BSA (Fraktion V)

Hybridisierung:

Die erste Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen ³²P-markierten Sonde gegen PTN. Die radioaktive Markierung der PTN-Sonde wurde unter Verwendung des RediPrime-Kits durchgeführt. Es folgte eine Hitzedenaturierung der Sonde bei 100°C. Anschließend wurde die Sonde zur Prähybridisierungslösung pipettiert und über Nacht bei 42°C inkubiert.

Die so hergestellte Hybridisierungslösung konnte nach Lagerung bei -20°C mehrfach verwendet werden. Dazu musste die Lösung vor jedem Gebrauch bei 100°C denaturiert

werden. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und die denaturierte Sonde auf die Membran gegeben.

Waschen:

Die Membran wurde anschließend 2 mal je 15 min mit 2x SSC, 0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Daran schlossen sich 2 weitere Waschgänge je 15 min mit 0,1x SSC, 0,1% SDS an.

Filmexposition:

Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingewickelt und in eine Hypercassette™ Expositionskassette mit Verstärkerfolie gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein BioMax MS Film aufgelegt. Da die Verstärkerfolie nur bei tiefen Temperaturen volle Wirkung entfaltet, wurden die Kassetten in den Gefrierschrank (bei -80°C) gelegt. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der mit dem Oberflächenzähler erfassten Strahlung.

Filmentwicklung:

Die Filme wurden aus der Kassette genommen und im Entwicklerbad inkubiert, bis die Signale deutlich zu erkennen waren. Darauf folgte ein kurzes Schwenken in der Stopplösung und eine längere Inkubation im Fixierbad. Die fertig entwickelten Filme wurden in klarem Wasser gespült und getrocknet.

<u>Entwickler:</u>	1:6 Verdünnung des Dokumol mit monodestilliertem Wasser
<u>Stopplösung:</u>	1% Essigsäure in monodestilliertem Wasser
<u>Fixierer:</u>	1,26 M Na ₂ S ₂ O ₅ * H ₂ O 0,11 M K ₂ S ₂ O ₅

Auswertung:

Zur Auswertung wurde der Blot auf einem Phosphorscreen exponiert. Die Expositionsdauer entsprach ca. der 3fachen Filmexposition. Mittels des Phosphorimagers wurde der Phosphorscreen ausgelesen und die Daten am Computer

bearbeitet. Anschließend mussten die Signale auf dem Screen durch Lichtexposition gelöscht werden.

18S-Sonde:

Ab dem Schritt „Prähybridisieren“ wurde die Vorgehensweise wiederholt. Statt der PTN-Sonde kam nun die 18S-Sonde zum Einsatz. Aufgrund des starken Signals wurden lediglich die ersten zwei Waschschrte mit 2x SSC, 0,1% SDS durchgeführt. Für die anschließende radiographische Auswertung war in der Regel eine Expositionsdauer von ca. 20 min ausreichend.

3.2.9 RT-PCR

Die RT-PCR dient zum qualitativen Nachweis von spezifischer mRNA. Nach der RNA-Präparation aus den Zellen muss diese RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dabei werden reverse Transkriptasen (= RNA-abhängige DNA-Polymerasen) verwendet. Durch den Gebrauch von kurzen random-Primern (Hexamere verschiedener Sequenz) entstehen unterschiedlich lange cDNA Fragmente. Dieser Teil der Reaktion dient der Erzeugung geeigneter Matrizen für die eigentliche PCR (Polymerasekettenreaktion). Für die anschließende PCR werden sequenzspezifische Primer genutzt. Bei diesem Schritt wird die gesuchte cDNA spezifisch amplifiziert und kann nachgewiesen werden. Alle Pipettierschritte wurden aufgrund der Empfindlichkeit der benutzten Enzyme auf Eis durchgeführt. Um Kontaminationen mit Fremd-RNA zu vermeiden, wurden die Reaktionsansätze für die reverse Transkription in der Sterilbank der Zellkultur pipettiert. Für die reverse Transkription benutzte Materialien wurden mit RNase Erase™ Spray behandelt um die RNA vor vorzeitigem Abbau zu schützen. Andere Verschmutzungsquellen wurden durch die Verwendung neuer, autoklavierter Einwegmaterialien ausgeschlossen.

Pipettierschema für die reverse Transkription:

	Ausgangskonzentration (-menge)	Volumen [µl]
pd(N)₆ random Primer	50 A ₂₆₀ U	4

RNA	5 µg	0,75-2,75
steriles bidestilliertes Wasser		ad 12,75
10 min 65°C Wasserbad, dann sofort auf Eis		
Transkriptor RT-Reaktionspuffer	5x	4
RNase Inhibitor (peqGold)	30 U/µl	0,75
dNTP-Mix	10 mM	2
reverse Transkriptase	20 U/µl	0,5

Nach kurzer Zentrifugation der Proben wurden diese in einen PCR-Thermocycler überführt, der wie folgt programmiert wurde:

Temperatur [°C]	Zeit [min]
25	10
55	30
85	5
4	∞

PCR:

Pro PCR-Tube wurden pipettiert:

Reagenz	Konzentration	Volumen
Taq Polymerasepuffer	10x	5 µl
MgCl₂	0,2 mM	3 µl
Primer sense	10 µM	1 µl
Primer antisense	10 µM	1 µl
dNTP	10 mM	2 µl
cDNA	-	2 µl

Taq Polymerase (Fermentas)		0,5 µl
steriles ddH₂O	-	ad 50 µl

Nach kurzer Zentrifugation der Proben wurden diese in einen PCR-Thermocycler überführt, der wie folgt programmiert wurde:

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94°C	2 min	1
94°C	30 s	35
52°C – 60°C*	45 s	
72°C	3 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	1

* 5°C unter der jeweiligen Schmelztemperatur des Primers, siehe Materialteil

Nach der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese wie unter 3.2.7 beschrieben durchgeführt. Anhand der Lage der Banden im Vergleich zu den Banden des mitgeführten Markers konnte auf die Größe des PCR-Produktes geschlossen werden. Das gab Aufschluss über das Vorhandensein der mRNA des jeweiligen Genprodukts in der entsprechenden Zelllinie. Außerdem zeigte es an, dass während der PCR das richtige Fragment amplifiziert wurde. Zusätzlich wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt. Die PCR Produkte wurden bei -20°C gelagert.

3.2.10 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der Real-Time-PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können. Real-Time-Detektionssysteme bestehen aus einem PCR-Thermocycler sowie einem optischen Detektionsmodul, über das die mit der Produktzunahme ansteigenden Fluoreszenzwerte online nach jedem Zyklus gemessen werden. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgt mittels der geeigneten

Computersoftware. Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten „Crossing Point“ (CP). Der CP-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines Referenzgens verglichen (z.B. GAPDH, 18S, Ubiquitin oder Cyclophilin an).

In den Real-Time-PCR in dieser Arbeit wurde die Expressionsrate von PTN und ALK untersucht. Zu diesem Zweck wurde die gesamt-RNA aus diesen Zellen gereinigt und in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle wurden zwei Haushaltsgene benutzt: GAPDH und β -Actin. Der Expressionslevel von stabil transfizierten Zellen wurde relativ zu WT und Leervektor-transfizierten Zellen bestimmt.

Bei der Real-Time-PCR wurden ausschließlich „Intron-Spanning“ Primer benutzt, die mit Hilfe eines Computerprogramms unter Benutzung von Gendatenbanken abgeleitet wurden (Probe-Library). Diese Primer erkennen homologe Sequenzen im Gen, die an der Grenze zwischen zwei Exons liegen. Befindet sich ein Intron dazwischen, kann der Primer nicht binden. Da die cDNA keine Introns enthält, kann der Primer ungehindert binden und zur Amplifizierung des Genprodukts beitragen. Aufgrund unvollständiger RNA-Reinigung kann die cDNA allerdings Reste genomischer DNA enthalten, an die sich die Intron-Spanning-Primer jedoch nicht anlagern können, so dass keine unerwünschte Amplifizierung genomischer DNA stattfindet. Somit wird ausschließlich der mRNA-Level des gewünschten Genprodukts gemessen.

Durchführung:

Die Real-Time-PCR wurde mit Light-Cycler-Kits von Roche und Qiagen durchgeführt. Der im Kit enthaltene Master-Mix besteht aus dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green I, einer Hot-Start DNA-Polymerase, einem PCR-Puffer und freien Nukleotiden. Zusätzlich pipettiert werden die zu untersuchende cDNA und gewünschte Primer-Paare.

Roche - Kit		
	Volumen	Ausgangs-Konzentration
steriles ddH₂O	4,5µl	-
Primer A	0,5µl	10µM
Primer B	0,5µl	10µM
Master Mix	2µl	5x
cDNA	2,5µl	1:10

Qiagen - Kit		
	Volumen	Konzentration
steriles ddH₂O	2µl	-
Primer A	0,5µl	10µM
Primer B	0,5µl	10µM
Master Mix	5µl	2x
cDNA	2µl	1:10

PCR – Bedingungen:

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit
Prä-Inkubation		95°C	10min
Amplifizierung (55 Zyklen)	Denaturierung	95°C	10s
	Anlagerung	55°C	10s
	Verlängerung	72°C	10s
Schmelzkurve	Denaturierung	95°C	0s
	Anlagerung	65°C	15s
	Aufschmelzen	auf 95°C in 0,1°C/s	
Kühlen		40°C	30s

Zur Bestätigung der Computerergebnisse wurden die PCR-Produkte mittels der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte nach der Delta-Delta CT-Methode und wurde in Form eines Balkendiagramms visualisiert.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}}) \Delta\text{Ct Zielgen (Kontrolle-Behandelt)}}{(E_{\text{Referenzgen}}) \Delta\text{Ct Referenzgen (Kontrolle-Behandelt)}}$$

3.2.11 Southern Blot

Wird ein Gen von der Zelle nur sehr schwach transkribiert, so kann es sein, dass man nach einer RT-PCR keine Banden im Ethidiumbromidgel erkennen kann, obwohl die RNA erfolgreich in cDNA ungeschrieben und anschließend amplifiziert worden ist. Mit Hilfe Southern Blots lassen sich schwache PCR-Banden spezifisch mit Hilfe radioaktiv markierter Nukleotidsonden nachweisen. Dazu werden die RT-PCR-Produkte nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylonmembran transferiert, wie unter 3.2.8 beschrieben mit folgenden Unterschieden:

1. Der Prähybridisierungspuffer enthält kein Formamid. Stattdessen wird das Volumen durch bidestilliertes Wasser aufgefüllt.
2. Die Blots werden gewaschen wie Northern Blots, die mit 18S Sonde hybridisiert wurden (2x 15 min mit 2x SSC, 0,1% SDS).
3. Eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen ein „house keeping gen“ (entsprechend der 18S Sonde) wurde nicht durchgeführt, da eine Quantifizierung nicht möglich ist.

3.3 Protein- und immunchemische Methoden

3.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels des Proteinassays von BioRad ermittelt. Für den Proteinassay wird eine Proteinverdünnungsreihe erstellt, mit Hilfe derer sich eine Eichgerade aufnehmen lässt. Hierfür eignet sich Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V in Aqua bidest. Der Biorad Proteinassay kann in 96-Well Platten durchgeführt werden. Das Versuchskit von Biorad besteht aus den drei Lösungen A, B

und S. Zunächst wird durch Mischen der Lösungen A und S im Verhältnis 50:1 die Lösung A* hergestellt. In eine Vertiefung der 96-Well Platte wird dann folgendes pipettiert:

22 µl Lösung A*

5 µl Protein (zu bestimmende Proteinlösung oder Standard)

177,6 µl Lösung B

15 min Inkubation bei Raumtemperatur.

Absorptionsmessung im ELISA-Reader bei 750 nm.

Anhand der Eichgeraden lässt sich nun die Proteinmenge in der zu untersuchenden Lösung bestimmen. Es empfiehlt sich, für den Versuch unterschiedliche Verdünnungen der Proteinprobe zu messen, um bei der Messung im ELISA-Reader Absorptionswerte im sicher linearen Messbereich des Gerätes zu erhalten.

3.3.2 PTN-Reinigung

Pleiotrophin ist ein heparin-bindender Wachstumsfaktor und kann folglich durch Affinitätschromatographie mittels Heparin-Sepharose aus den Medienüberständen von PTN exprimierenden Zelllinien ankonzentriert werden.

Dabei werden alle im Medium enthaltenen Heparin-bindenden Proteine an den gruppenspezifischen Liganden Heparin reversibel adsorbiert. Durch Erhöhung des Salzgradienten während der Elution werden die Proteine nacheinander abgelöst und erscheinen im Eluat.

In einem anschließenden Western Blot kann die Eluatfraktion ermittelt werden, die das ankonzentrierte Pleiotrophin enthält.

Die gesamte Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt, um einen Abbau der Proteine zu vermeiden.

Die folgende Anleitung beschreibt die Reinigung aus 10ml Zellkulturmedium, sie wurde jedoch unter Einhaltung der Proportionen mit bis zu 1l Medium durchgeführt.

Probenvorbereitung:

Von einer mittleren Kulturflasche wurden 10 ml Zellkulturmedium geerntet und 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Damit konnte der Überstand von Zelltrümmern gereinigt werden.

Vorbereitung der Säulen:

Für die konditionierten Medien wurde je eine Heparin-Sepharose-Säule vorbereitet. Dazu wurde jede Säule nach Vorquellen des Säulenmaterials (Heparin-Sepharose) in 50 mM Tris / 0,5 M NaCl, pH 7,5 mit 100 µl dieser Suspension (10 µl / ml Medium) befüllt, was einem Bettvolumen von 50 µl entsprach.

Äquilibration:

Die Säule wurde von unten verschlossen und mit 50 mM Tris / 0,5 M NaCl, pH 7,5 befüllt. Das Säulenmaterial wurde in dem Puffer resuspendiert, die Säule unten geöffnet und der Durchfluss verworfen. Bei allen folgenden Schritten wurde das Säulenmaterial in der eingefüllten Lösung resuspendiert, der Verschluss geöffnet und die Lösung aufgefangen.

Adsorption:

10 ml Medium wurden mit 10 ml 100 mM NaCl / 1M Tris, pH 7,5 gemischt und die Säule wurde damit beladen (Endkonzentration = 50 mM NaCl / 0,5 Tris, pH 7,5).

Waschen:

Die Säulen wurden 2x mit 2 ml 50 mM Tris / 0,5 M NaCl, pH 7,5 gewaschen.

Elution:

Der Elutionspuffer bestand aus 50 mM Tris, 1M NaCl pH 7,5 (erhöhte Salzkonzentration).

Es wurden vier bis fünf Elutionsschritte mit 100 µl dieses Puffers durchgeführt. Alle Eluatfraktionen wurden später im Western Blot untersucht und diejenigen, die PTN enthielten, wurden vereinigt. Um die PTN-Konzentration für Stimulationsexperimente zu erhöhen und um das Salz zu entfernen wurde das Eluat im Centricon-Röhrchen eingengt und mit Phosphat-Puffer umgepuffert.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Vor der elektrophoretischen Auftrennung wird die Tertiärstruktur durch thermische Denaturierung bei 100°C im SDS-haltigen Probenauftragspuffer zerstört. Durch den Zusatz dieses anionischen Detergenz wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Niedermolekulare Thiole wie β -Mercaptoethanol im Probenauftragspuffer bewirken eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten.

Für den PTN-Western Blot wurde ein 15% Gel benutzt.

Rezeptur:	
<u>4% Sammelgellösung:</u>	10% RotiPhorese® Gel 40 (38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid) 12,5% 1 M Tris/HCl, pH 6,8 1% 10% SDS ad 100% mit bidestilliertem Wasser
<u>15% Trenngellösung:</u>	35% RotiPhorese® Gel 40 (38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid) 37,5% 1 M Tris/HCl, pH 8,9 1% 10% SDS ad 100% mit bidestilliertem Wasser

Vorbereitungen:

Pro Gel wurden 2 unterschiedlich große Glasplatten, ein Kamm und 2 Abstandshalter derselben Stärke mit Wasser und Isopropanol gründlich geputzt und in der Gießvorrichtung des Miniprotean II Systems von BioRad dicht eingespannt.

Ansetzen der Gele:

Die Ausgangslösungen wurden durch Sterilfiltration entgast, damit Sauerstoffradikale die Polymerisation nicht stören können.

Für die Vorbereitung von 2 Trenngelen wurden folgende Chemikalien pipettiert:

<u>15% Trenngel:</u>	12,5 ml 15% Trenngellösung 62,5 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat) 6,25 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)
----------------------	---

Durch Invertieren des Röhrchens wurde die Lösung gemischt und anschließend zügig zwischen die Platten gegossen. Um die Oberfläche zu begradigen, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nachdem es auspolymerisiert war, konnte der Isopropanol abgesaugt und die Sammelgelmischung eingefüllt werden.

<u>Sammelgel:</u>	5 ml 4% Sammelgellösung 25 µl APS 12,5 µl TEMED
-------------------	---

Nun konnte der Kamm eingesetzt werden und das Gel polymerisierte aus.

Probenvorbereitung:

20 µl Probe wurden mit 6 µl 4x Ladepuffer versetzt.

<u>4x Ladepuffer:</u>	40% β-Mercaptoethanol 20% Glycerin 4% SDS 0,01% Bromphenolblau ad 100% mit bidestilliertem Wasser
-----------------------	---

Es folgte 5min Inkubation bei 100°C

Elektrophorese:

Die Gele wurden in eine Mini Protean II Zelle eingesetzt, so dass sie von dem 1x SDS-Laufpuffer in der Zelle vollständig umspült wurden. Der 1x SDS-Laufpuffer wurde durch Verdünnen mit Wasser aus 10x SDS-Laufpuffer hergestellt.

<u>10x SDS-Laufpuffer:</u>	14,4% Glycin 2,9% Tris 1% SDS in monodestilliertem Wasser
----------------------------	--

Die Kämme wurden vorsichtig aus dem Gel entfernt. Die schwach sichtbaren Taschen wurden mit 1x SDS-Laufpuffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Anschließend wurden die Proben sowie 6 µl Prestained Protein Ladder (10-180 kDa) in die Taschen eingefüllt.

Es wurde für ca. 30 min eine Spannung von 200 V angelegt.

Nachdem das Bromphenolblau aus dem Gel gelaufen war, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde aus den Platten ausgebaut und stand nun für einen Western Blot zur Verfügung.

3.3.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine spezifische immunchemische Nachweismethode für Proteine. Dazu werden die durch Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine mittels ElektrobloTTings auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und immobilisiert. Ein gegen das gesuchte Protein gerichteter Primärantikörper bindet mit seiner F_{ab}-Region spezifisch an das immobilisierte Protein. Ein mit Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper bindet den F_c-Teil des Primärantikörpers. Die Peroxidase setzt in der anschließenden Reaktion das Nachweisreagenz um und führt damit eine Lichtemission herbei. Die Chemilumineszenz wird durch Auflegen eines Hyperfilm™ ECL™ Films visualisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Western Blot zum Nachweis von PTN in den Eluatfraktionen nach der Affinitätschromatographie benutzt.

Durchführung:

Um Kontamination durch Fremdprotein zu vermeiden, wurde ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet. Der Primärantikörper wurde in einer 1:1500 Verdünnung mehrere Male verwendet. Der Zusatz von 0,1% NaN₃ verhinderte das Bakterienwachstum und verlängerte dadurch die Haltbarkeit der Antikörperlösung.

SDS-PAGE:

Es wurde eine wie unter 3.3.3 beschriebene SDS-PAGE mit den Produkten der Proteinreinigung (inklusive Durchlauf und Waschlösungen) durchgeführt.

Aufbau der Blotapparatur:

1x Transferpuffer wurde durch Verdünnen mit monodestilliertem Wasser hergestellt und in die EI9001-XCELL II-Transferkammer gefüllt.

<u>20x Transferpuffer:</u>	14,4% Glycin 2,9% Tris pH auf 8,3 eingestellt
----------------------------	---

Alle Schichten des Blots wurden vorab im Transferpuffer eingeweicht.

Für 35 min wurde eine Spannung von 25V angelegt. Danach wurde die Apparatur abgebaut und die Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten.

<u>10x TBST (Tris-buffered saline + Tween 20):</u>	1,5 M NaCl 100 mM Tris 0,5% Tween 20
--	--

Immunchemischer Nachweis:

Schritt	Reagenz	Inkubations-dauer	Wiederholungen
Abspülen des Transferpuffers	1x TBST	3 min	
Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran	5% Milchpulver in TBST	1 h	
Waschen	1x TBST	10 min	3
Primärantikörperbindung	anti-PTN IgG (Verdünnung: 1:1500; goat polyclonal)	über Nacht bei 4°C	

Waschen	1x TBST	10 min	3
Sekundärantikörperbindung	donkey anti goat IgG- HRP (Verdünnung: 1:3000 in TBST)	1 h	
Waschen	1x TBST	10 min	3

Während des letzten Inkubationsschritts wurde das Nachweisreagenz frisch angesetzt. Es handelte sich hierbei um eine wässrige Lösung von 10% LumiGLO™ Reagent und 10% LumiGLO™ Peroxid. Der Western Blot wurde mit dieser Lösung eine Minute lang inkubiert, bevor ein Hyperfilm™ ECL™ Film in einer Hypercasette™ Expositionskassette aufgelegt wurde. Die Dauer der Filmexposition betrug 30 s bis maximal 15 min. Der Film wurde anschließend entwickelt (siehe 3.2.8).

3.3.5 PTN-ELISA

Die Abkürzung ELISA steht für Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Der hier zu beschreibende ELISA ist eine immunochemische Nachweismethode für Pleiotrophin. Durch die Anwendung des Sandwichprinzips und der sog. ABC-Technik wird eine außerordentlich hohe Sensitivität erreicht. Dazu werden die Wells einer 96-Well Platte mit Antikörpern gegen PTN beladen, an die PTN im darauf folgenden Schritt spezifisch bindet. Der am F_c-Fragment mit Biotin konjugierte sekundäre Antikörper (Detektionsantikörper) bindet das auf der Plastikoberfläche durch den 1. Antikörper immobilisierte Pleiotrophin mit seinem F_{ab}-Fragment. Das Biotin bindet das im folgenden Schritt zuzugebende Avidin, welches mit einer Peroxidase konjugiert ist. Das Enzym setzt in der Schlussreaktion das Substrat um, wodurch es zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag kommt.

Eine mitgemessene Verdünnungsreihe bekannter Konzentration ermöglicht eine Umrechnung der Absorptionen in Konzentrationen. Als externer Standard wurde rekombinantes, humanes PTN der Firma R&D Systems benutzt.

Durchführung:

Am Abend vor der eigentlichen Durchführung wurde in jedes Well einer 96-Well Platte 100 µl einer 1:5000 Verdünnung (in TBS) von Aszites einer gegen Pleiotrophin immunisierten Maus pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle weiteren Inkubationen fanden wegen besserer Bindungs- und Verteilungsmöglichkeit bei Raumtemperatur auf einem Schüttler statt.

10x TBST für ELISA:	1,5 M NaCl 100 mM Tris 0,5% Tween Acros
---------------------	---

Durch Verdünnen mit monodestilliertem Wasser wurde die 1x Konzentration hergestellt.

Schritt	Reagenz	Volumen [µl]	Inkuba- tionsdauer	Wieder- holungen
Waschen	1x TBST	100	5 min	3
Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf der Plastikoberfläche	1% BSA in TBST	200	1 h	
Waschen	1x TBST	100	10 min	3
PTN-Bindung	Probe	100	1h	
Waschen	1x TBST	100	10 min	3
Bindung des biotinylierten Antikörpers	anti-h Pleiotrophin 100 µg/µl	100	1 h	
Waschen	1x TBST	100	10 min	3
Bindung des mit Peroxidase beladenen Avidins	Streptavidin-AP Conjugate 1000U (Verd.: 1:10000)	100	1h	
Waschen	1x TBST	100	10 min	3

Zum Ansetzen des Phosphatase-Substrats wurde ein Kit der Firma PIERCE verwendet. Pro Well wurden 100 µl pipettiert und die 96-Well Platte anschließend lichtgeschützt (mit Alufolie abgedeckt) 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Die photometrische Auswertung wurde mit dem MRX Microplate Reader bei 405 nm vorgenommen. Waren die Absorptionen noch sehr niedrig, erfolgte eine zweite Messung nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C.

3.3.6 Apoptose-ELISA

Die Apoptose wurde mit Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim) anhand von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten quantifiziert, die während der Apoptose durch Karyolyse in das Cytoplasma der Zelle gelangen. Für einen Ansatz wurden jeweils 30000 Zellen einer Zelllinie bzw. eines Konstrukts (wt, pRc/CMV, PTN-Rz66 oder PTN-Rz261) in 3 Wells einer 12-Well-Platte pipettiert, zwei Tage wachsen gelassen und das Medium einmal gewechselt. Eine weitere Inkubation erfolgte über 48 h. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert (100 µl Trypsin/EDTA) und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 900 µl Medium überführt. Ein kleiner Teil (70 µl) wurde zur Quantifizierung der Probenzellzahl in eine 96-Well-Platte erneut eingesät und ca. 4 h später mit dem WST-1 Cell Proliferation Reagent gemessen (siehe 2.4.3).

Die Zellen im Eppendorf Reaktionsgefäß wurden bei 2000 rpm 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 250 µl Inkubationspuffer resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm (10 min) wurden von dem Überstand äquivalente Mengen (anhand der WST-1 Zellzahlmessung (s.o.) zu ermitteln) in den ELISA eingesetzt. Dazu wurden die Proben teilweise mit Inkubationspuffer verdünnt. Vor dem Pipettieren der Proben in die ELISA-Platte fand die Erstantikörper-Beschichtung der einzelnen Vertiefungen statt. Hierzu wurden 100 µl Beschichtungslösung (Anti-Histon in Beschichtungspuffer 1:10) pro Vertiefung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Blockierung mit 200 µl Inkubationspuffer (30 min RT). Nach gründlichem Ausklopfen und dreimaligem Waschen der Vertiefungen mit 300 µl Waschlösung wurden jeweils 100 µl Probenlösung 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Inkubation des 2. Antikörpers mit 100 µl

Konjugatlösung (Anti-DNA-POD in Inkubationspuffer 1:10) für 90 min bei RT. Die Substrat-Reaktion erfolgte nach wiederholtem Waschschrift durch Zugabe von jeweils 100 µl Substratlösung pro Well. Die Absorptionsmessung wurde nach dem Eintreten einer Grünfärbung im ELISA-Reader bei 405 nm durchgeführt.

3.3.7 Immunhistochemische Färbung von Paraffin-fixierten Tumorschnitten

Die Tumorschnitte wurden zunächst 2 x 10 min in Xylol deparaffiniert (bzw. Roti-Clear oder Tissue-Clear). Danach folgte das zweifache Waschen a 5 min im 100% Ethanol und die Rehydratisierung mit einer absteigenden Alkohol-Reihe mit je 2 min im 90%, 80% und 70%-igen Ethanol. Das Ethanol wurde 1 min mit ddH₂O abgewaschen und danach wurden die Schnitte 5 min in PBST inkubiert. Zur Epitop-Demaskierung, wurden die Schnitte 15 min lang in einem 90°C heißen Citratpuffer-Bad inkubiert (9ml 0,1 M Zitronensäure + 41ml 0,1 M Natriumcitrat mit ddH₂O auf 500 ml auffüllen). Nach 10 min Abkühlung wurde wieder 5 min mit PBST gewaschen.

Als optionale Behandlung für Antikörper, die tief im Gewebe befindliche Strukturen erkennen (z.B. bei vWF-Ab), wurde der Proteinase-K-Verdau durchgeführt, um eventuell störende Proteine zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte 5 - 15 min bei Raumtemperatur in einer 0,025% Proteinase-K-Lösung inkubiert. Für die Inhibition potentieller interner Peroxidasen wurden die Schnitte im weiteren Verlauf 30 min bei 4°C in 200ml PBST mit 2 ml H₂O₂ inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreifaches Waschen mit PBST.

Nach Abtrocknung der Objektträger und Begrenzung der Schnittfläche mit einem Fettstift (verhindert späteres Vermischen der Antikörper und reduziert das eingesetzte Volumen) wurden die Schnitte mit 100 bis 200 µl Blockierlösung bedeckt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Blockierlösung bestand aus 2% BSA, 10% Serum aus dem Tier, aus dem der Zweitantikörper stammte, und PBST. Die Blockierung, die das unspezifische Binden des Antikörpers verhindert, sowie alle weiteren Schritte mit relativ geringen Reagenzvolumen erfolgten in einer Feuchtkammer. Danach wurde die Blockierlösung abgesaugt und 100 bis 200 µl Erstantikörperlösung (in PBST mit 2% BSA) auf die Schnitte pipettiert. Der Erstantikörper verblieb über Nacht auf den

Schnitten. Anschließend wurden die Schnitte 3x mit PBST gewaschen und 1 h in der Zweitantikörperlösung inkubiert. Die eingesetzten Zweitantikörper waren biotinyliert und gegen den jeweiligen Erst- Antikörper gerichtet, aus dem der Erstantikörper stammte.

Nach erneutem dreifachen Waschen mit PBST wurden die Tumorschnitte eine Stunde bei 37°C in der ABC-Lösung inkubiert. Diese wurde 30 min vor dem Einsetzen unter Verwendung des ABC-Kits von Vector vorbereitet (2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B in 5 ml ddH₂O). Die ABC-Lösung enthält verzweigte Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplexe, die über freie Biotin-Bindungsstellen verfügen und von dem jeweiligen Zweitantikörper gebunden werden können.

Nach der Kopplung mit Meerrettichperoxidase wurden die Schnitte erneut drei Mal mit PBST gewaschen und 1-10 min in der Substratlösung inkubiert bis eine spezifische Färbung auftrat. Die DAB-Lösung wurde kurz vor Gebrauch angesetzt (250mg DAB in 50 ml ddH₂O, 180ml PBST, 20ml 1M Tris HCl pH 7,5 und 25µl H₂O₂). DAB wird von der Meerrettichperoxidase umgesetzt und fällt in Form eines braunen, unlöslichen Präzipitats aus. Nach dem Unterbrechen der Färbung mit dH₂O wurden die Schnitte teilweise 1-2 min mit Hämatoxylin gegengefärbt um einen besseren Kontrast zu erzeugen (nicht bei der PTN-Färbung). Die blaue Hämatoxylin-Färbung manifestiert sich bei der anschließenden Inkubation im Wasserbad.

Die gefärbten Tumorschnitte wurden schließlich mikroskopisch begutachtet, in einem wässrigen Einbettmedium versiegelt (Dako-Faramount Aqueous Mounting Medium) und mit Deckgläschen verschlossen. Aufgrund der Unterschiede in der Färbeintensität wurde eine computergestützte grafische Darstellung angefertigt, die auf randomisierten Zählungen von Labormitarbeitern bzw. auf densitometrischer Analyse beruhte.

Erst-antikörper	Her-steller	Ver-dünnung	Blockier-serum	Zweit-antikörper	Ver-dünnung
anti-hPTN	R&D Systems	1:100	horse	biotinylated anti-goat	1:150

anti-PTN N-15	Santa Cruz	1:40	horse	biotinylated anti-goat	1:150
anti-ALK ALK1	Dako	1:25	horse	biotinylated anti-mouse	1:150
anti-PCNA	Dako	1:300	horse	biotinylated anti-mouse	1:150
anti-vWF	Dako	1:300	goat	biotinylated anti-rabbit	1:150
anti-vWF	Boehringer Mannheim	1:200	horse	biotinylated anti-mouse	1:150

Die Apoptoserate der Tumorzellen wurde mit Hilfe des „In Situ Cell Death Detection-Kits, POD“ von Roche-Mannheim untersucht.

3.4 Stabiles Ribozym-Targeting

Bei diesen Versuchen wurden Zelllinien verwendet, die mit Ribozym-kodierenden Expressionsplasmiden stabil transfiziert wurden. Die Ribozyme sind gegen den Wachstumsfaktor PTN bzw. seinen Rezeptor ALK gerichtet. Als Kontrolle dienten WT- und Leervektor-transfizierte Zellen. Die Zellen wurden in der Zellkultur passagiert und vermehrt, bis die für diese Experimente benötigte Zellzahl erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und gezählt.

Jeweils 2 Mio Zellen wurden in 200µl sterilem PBS resuspendiert und in die Flanken der Mäuse subkutan injiziert. Pro Maus erfolgten zwei Injektionen und die Gruppen bestanden aus mindestens 5 Mäusen pro getestete Zelllinie. Nach der Injektion wurden die Mäuse zunächst beobachtet und sobald Tumorwachstum sichtbar war, wurde mit der Messung der Tumoren begonnen. Gemessen wurde im Abstand von zwei Tagen bis zur Terminierung des Versuchs, nach dem Erreichen der für die Mäuse zumutbaren Tumormasse. Die aus der Länge und Breite der Tumoren ermittelte Fläche der Tumoren einer Gruppe wurde summiert und in Form von Wachstumskurven graphisch ausgewertet. Anschließend wurden die Tumoren entfernt, gewogen und für weitere Analysen verwendet. Dazu wurden von den Tumoren Gewebeschnitte für

immunhistochemische Färbungen angefertigt. Ein Teil der Tumormasse diente der RNA-Gewinnung zur Untersuchung des PTN-Levels in den Tumoren.

Nachdem für die Einzeltargeting-Experimente stabil transfizierte Zelllinien mit jeweils einem Ribozym-Konstrukt hergestellt worden waren, wurden für die Doppeltargeting-Studien Zelllinien mit beiden Rz-Konstrukten generiert. Dazu wurden die bereits transfizierten Zellen mit dem zweiten, fehlenden Rz-Konstrukt zusätzlich stabil transfiziert. Aufgrund der Tatsache, dass beide Ribozym-Typen (PTN und ALK) im gleichen Plasmid kloniert waren (pRc/CMV), musste mit Hilfe einer Ko-Transfektion ein weiteres, leeres Plasmid mit einem zusätzlichem Selektionsmarker benutzt werden. Nach der Ko-Transfektion mit dem fehlenden Ribozym und einem Hilfsvektor im zehnfachen Überschuss wurden die Zellen mit einem anderen Antibiotikum (Puromycin bzw. Zeomycin) selektioniert und für weitere Experimente verwendet. Für die Doppeltargeting-Studien wurden die Glioblastom-Zellen U87MG verwendet, die in folgenden Kombinationen transfiziert wurden: ALK-Rz3-2/PTN-Rz261, PTN-Rz66/ALK-Rz1-3 und PTN-Rz66/ALK-Rz12-1. Mit dem zuerst aufgeführten Ribozym waren die Zellen initial transfiziert und die an zweiter Stelle stehende Bezeichnung repräsentiert das durch die Ko-Transfektion eingeschleuste Ribozym. Um unspezifische Effekte durch Integration an essentiellen Stellen des Genoms zu vermeiden, wurden die Zellen nicht klonal selektioniert, sondern als massentransfizierte Linien belassen.

3.5 Tierversuche

Für die Tierexperimente wurden athymische Nacktmäuse (nu/nu) verwendet. Dies erlaubte die Benutzung humaner Tumorzelllinien um subkutan solide Tumoren zu generieren. Die Mäuse wurden unter artgerechten Bedingungen gehalten (konstante Temperatur und Druck sowie wasserdampfgesättigte Atmosphäre) und jeweils nur einmalig für Experimente verwendet.

3.5.1 siRNA-Targeting

Im Falle der Herunterregulierung der PTN-Expression mit Hilfe der siRNA wurde mit den Zellen wie unter 3.4.1 beschrieben verfahren. Bei den siRNA-Versuchen wurden

lediglich WT-Zellen verwendet, die ebenfalls mit 2 Mio Zellen pro Injektion eingesetzt wurden. Die Injektionen wurden subkutan in die Flanken athymischer Nacktmäuse appliziert. Nach Ausbildung solider Tumoren erfolgte in zwei- bis dreitägigen Abständen die Behandlung mit siRNA/PEI-Komplexen gegen PTN. Die Komplexe wurden folgendermaßen vorbereitet:

Ansatz für eine Injektion:

- 1) 8 µg siRNA (anti-PTN-siRNA oder anti-Luc-siRNA als Negativ-Kontrolle) wurden in 100µl Hepes/NaCl-Puffer gelöst.
- 2) 16µl 4xJetPEI wurden zusammenpipettiert mit 84 µl Hepes/NaCl-Puffer
- 3) Nach 5 min Inkubation bei RT wurde das PEI/Hepes-Gemisch zum siRNA/Hepes-Gemisch dazupipettiert.
- 4) Die Komplexbildung erfolgte während einer 45 min andauernden Inkubation bei RT.
- 5) Anschließend wurde das Gesamtvolumen von 200 µl intraperitoneal bzw. proxitumoral in die Flanken athymischer Nacktmäuse injiziert.

Parallel zur Behandlung wurde die Größe der Tumoren gemessen. Die anschließende graphische Auswertung sowie die Tumor-Analytik erfolgte wie beim stabilen Rz-Targeting (s. 3.4.1).

4 Ergebnisse

4.1 *Nachweis der Expression von PTN, MK, ALK und PTPR ζ*

4.1.1 PTN-Screening

Für die Untersuchung der Funktion von Pleiotrophin (PTN) und Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) beim Tumorwachstum wurden zunächst stabile Tumorzelllinien auf die Expression dieses Wachstumsfaktor-Rezeptor Paares mit Hilfe des Northern-Blotting Verfahrens untersucht. Generell kann man die untersuchten Zelllinien in vier Gruppen einteilen: Glioblastome (U87MG, T98G, G55T2, GH, NT2), Kolonkarzinome (Lovo, LS174T, LS180, SW480, SW620, Colon201), Hodenkarzinome bzw. Teratokarzinome (NCCIT, 2102Ep) und Nebennierenkarzinom (SW13). Die zu untersuchenden Zelllinien wurden mit dem Tri-Reagenz lysiert und die Gesamt-RNA wurde aufgereinigt. Nach der anschließenden Auftrennung der Proben im Agarosegel und dem Transfer auf eine Nylon-Membran wurden die Membranen mit einer „full-length“ PTN-Sonde hybridisiert und die PTN-Signale über Autoradiographie detektiert. Die Glioblastom-Zelllinien U87MG, G55T2 und T98G zeigen eine starke PTN-Expression gefolgt von Hodenkarzinom-Zelllinien NT2, NCCIT und 2102Ep. Von den Kolonkarzinom-Zelllinien zeigt nur Lovo eine mäßige PTN-Expression. Die hier benutzte Nebennierenkarzinom-Zelllinie SW13 exprimiert nativ kein PTN. Diese Zelllinie wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit mit einem PTN-Expressionsvektor stabil transfiziert (SW13-PTN) und für die Gewinnung von rekombinantem PTN eingesetzt. Das Northern Blot-Screening (Abb. 4.1) bestätigt die Überexpression von PTN in dieser Zelllinie. Die SW13-ALK-Zellen repräsentieren eine rekombinant ALK-exprimierende Zelllinie und exprimieren ähnlich wie die SW13 wt-Zellen kein PTN.

Die Bestätigung der PTN-Expression wurde mit Hilfe der RT-PCR durchgeführt siehe Abb. 4.2). Hier wurde ein Primerpaar benutzt, das einen Abschnitt von 550bp innerhalb des PTN-Gens flankiert. Als Matrize für die Amplifizierung wurde neben der cDNA, die aus der Umschreibung der Gesamt-RNA stammte, ein PTN-Expressionskonstrukt als Positivkontrolle eingesetzt.

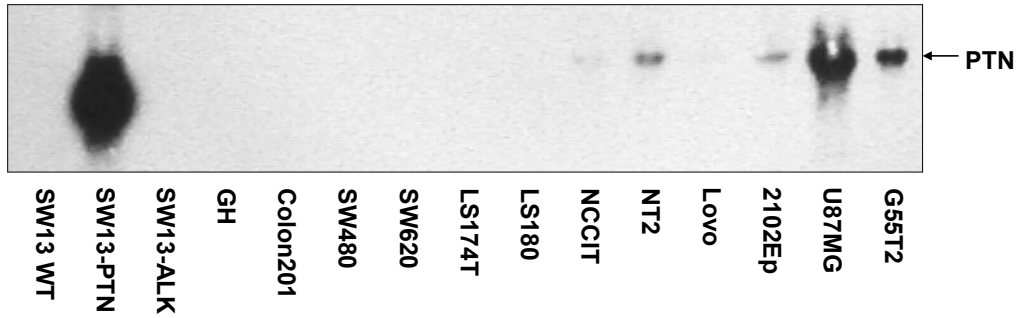


Abbildung 4.1 – Nachweis der PTN-Expression in Tumorzelllinien auf mRNA-Ebene (Northern Blot)

Die anschließende elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ergab ein Resultat, das mit dem des Northern Blots übereinstimmte. Um die Spezifität des amplifizierten Produkts zu bestätigen, wurden die PCR-Produkte auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einer PTN-Sonde hybridisiert. Die anschließende autoradiographische Auswertung dieses Southern Blots zeigte ähnliche Bandenintensitäten und bekräftigte die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente.

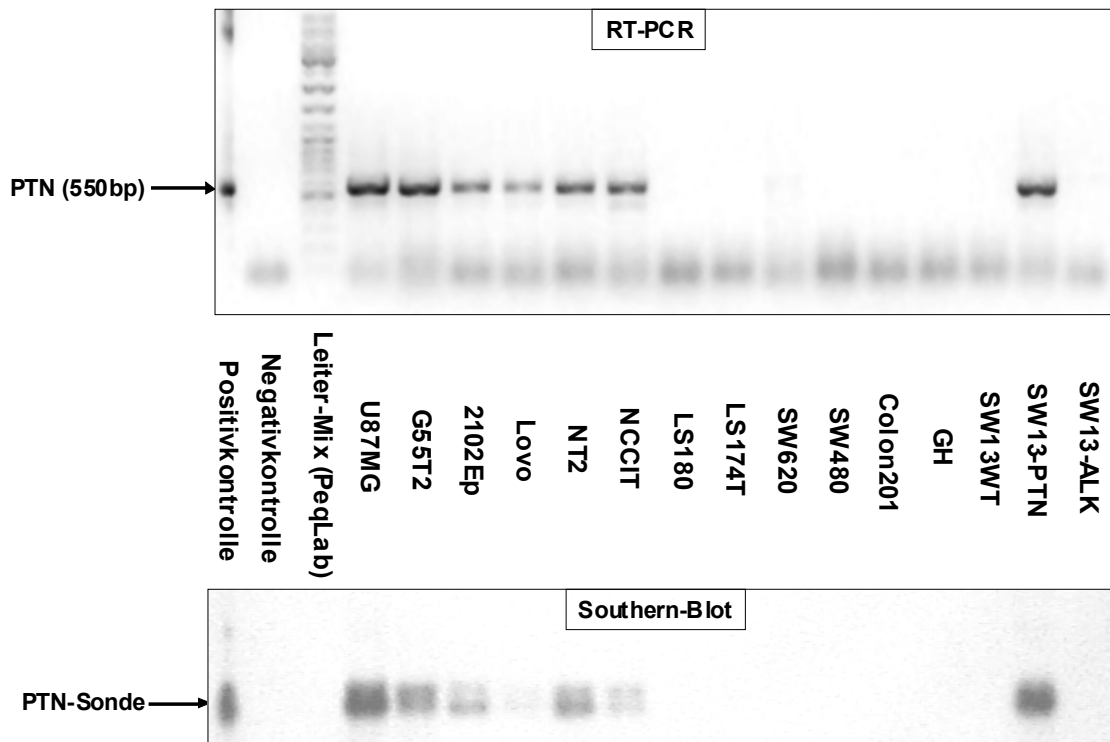


Abbildung 4.2 – PTN-Screening mittels RT-PCR und Southern Blot

4.1.2 ALK-Screening

Das ALK-Screening gestaltete sich aufgrund der sehr niedrigen mRNA-Konzentrationen des Rezeptors in den Zellen etwas schwieriger. Da die Northern Blot-Experimente mit radioaktiven ALK-Sonden keine eindeutigen Ergebnisse ergaben, wurde als sensitivere Methode die RT-PCR benutzt. Das erwartete Produkt sollte auf einer Höhe von 604bp erscheinen und entspräche der Liganden-Bindedomäne von ALK. Trotz sorgfältiger Wahl der Reaktionsbedingungen gelang es in der Erst-PCR aufgrund der geringen Produktmenge nicht, distinkte Banden zu erhalten. Um die Produkte aus der Erst-PCR spezifisch zu vervielfältigen, wurde ein Teil der jeweiligen Probe in der Nested-PCR als Template eingesetzt. Bei dieser PCR-Reaktion wurde ein Primerpaar benutzt, das eine innerhalb des primär amplifizierten Gen-Abschnitts liegende Sequenz flankiert. Damit wurde sichergestellt, dass sich die neuen Primer nur an ALK-spezifische Produkte aus der Erst-PCR anlagern können.

Die Auswertung der Nested-PCR ergab spezifische Produkte auf der erwarteten Höhe von 234bp und ermöglichte ein effizientes ALK-Screening. Daraus folgte, dass fast alle untersuchten Zelllinien diesen Rezeptor exprimieren. Die Ausnahme stellten die SW13-wt Zellen dar, bei denen keine Bande sichtbar war. SW13-ALK Zellen wurden zuvor mit einem ALK-Expressionskonstrukt transfiziert und exprimieren rekombinant den ALK-Rezeptor. Als bemerkenswert stellte sich die Tatsache heraus, dass PTN-überexprimierende SW13-PTN Zellen eine ALK-Expression aufweisen, was auf eine autokrine Hochregulierung hindeuten könnte. Die Lovo-Zellen zeigten als einzige PTN-positive Kolonkarzinom-Zelllinie auch eine schwache ALK-Expression. Die hier untersuchten Glioblastom- und Hodenkarzinom-Zelllinien exprimieren ebenfalls den ALK-Rezeptor.

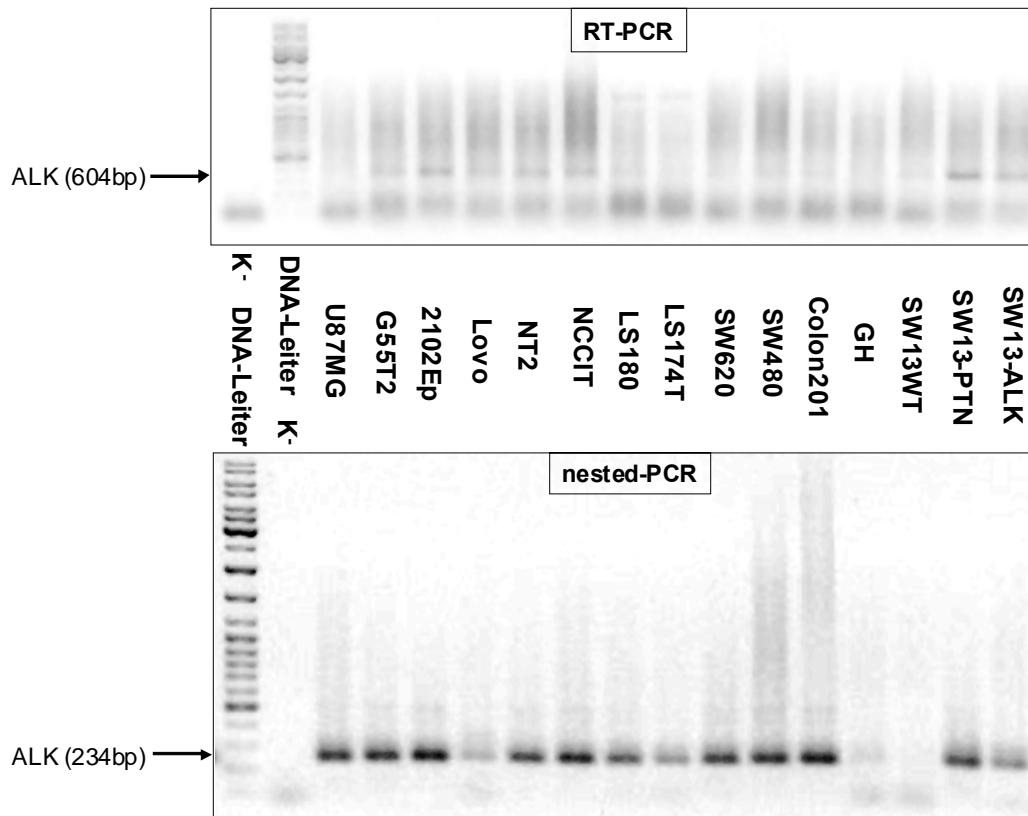


Abbildung 4.3 – ALK-Screening mittels RT-PCR und Nested-PCR

4.1.3 MK und PTPR ζ -Screening

Auch das Vorkommen des mit PTN verwandten Wachstumsfaktors Midkine (MK) sowie des alternativen PTN-Rezeptors PTPR ζ wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit bei folgenden Zelllinien untersucht:

- Glioblastom (U87MG, T98G, G122, U118, G55T2, GH)
- Kolonkarzinom (Colon201, LS174T, LS180, SW480, SW620)
- Hodenkarzinom (2102Ep, NT2)
- Nebennierenkarzinom (SW13, SW13-PTN, SW13-ALK)

Die Analytik erfolgte mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR, bei der MK-, PTPR ζ - und β -Actin-spezifische Primer eingesetzt wurden (Abb. 4.4).

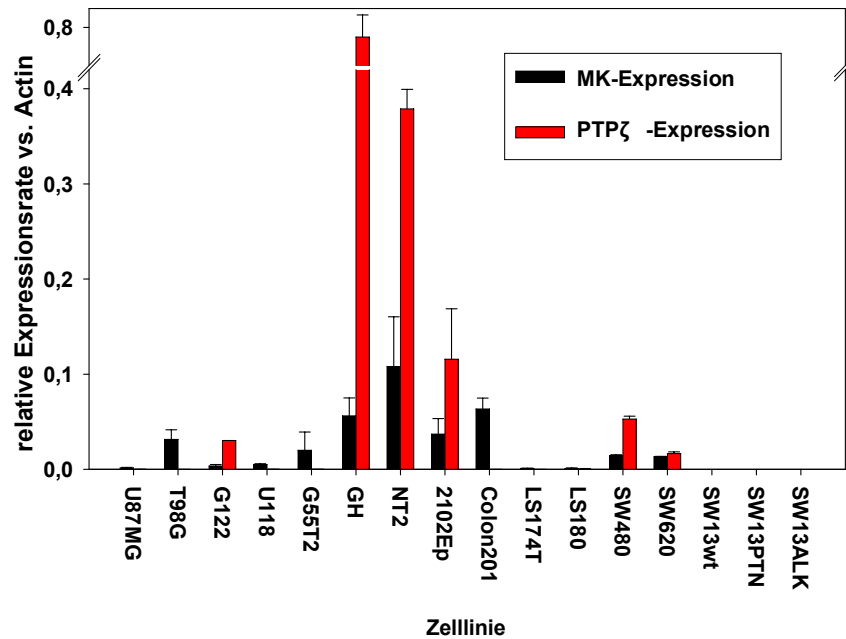


Abbildung 4.4 - MK und PTP ζ -Screening mittels RealTime-PCR

Die Expression von MK variiert stark zwischen den untersuchten Zelllinien und ist am stärksten ausgeprägt bei den Zelllinien glialen Ursprungs GH und NT2 sowie den Kolonkarzinomlinien Colon201 und 2102Ep. Bis auf Colon201 exprimieren diese Zellen ebenfalls den Rezeptor PTP ζ . Bei den MK-exprimierenden Zelllinien GH und NT2 fällt das Verhältnis relativ stark zugunsten von PTP ζ aus. Kolonkarzinomlinien SW480 und SW620 weisen eine mäßige Expression beider untersuchten Genprodukte auf. Bei einigen Zelllinien konnte nur MK alleine (T98G, G55T2 und Colon201) detektiert werden.

4.2 PTN-Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen

4.2.1 PTN-Herstellung

Für die Untersuchung der Funktion von Pleiotrophin beim Tumorwachstum wurde zunächst eine stabile, PTN-überexprimierende Zelllinie generiert. Der Expressionsvektor basiert auf dem pRc/CMV-Plasmid, in das ein PTN-ORF kloniert wurde. Der starke CMV-Promotor sorgt für eine konstitutive PTN-Expression und die Neo-Kassette ermöglicht eine effiziente Selektion mit G418.

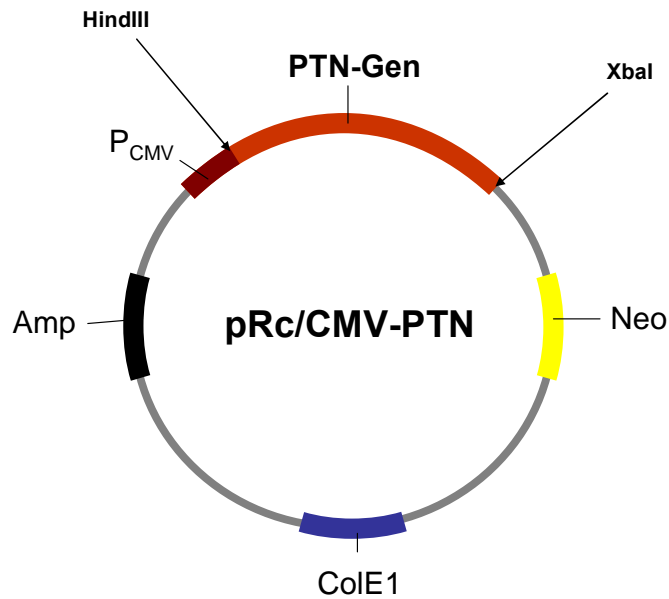


Abbildung 4.5 – Vereinfachte Plasmidkarte des PTN-Expressionsvektors

PTN-Überexpression in Nebennierenkarzinomzellen

Für die rekombinante Überexpression von PTN wurde aufgrund der fehlenden nativen Expression die Nebennierenkarzinom-Zelllinie SW13 ausgewählt. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des kationischen Polyethylenimins JetPEI und stabile Transfektanten wurden anschließend mit G418 selektioniert.

Aus den stabil transfizierten Zellen wurde die Gesamt-RNA gereinigt für die Analyse mit Hilfe der Northern Blotting-Verfahrens eingesetzt. Die Hybridisierung mit einer ³²P-markierten PTN-Sonde ergab bei der autoradiographischen Auswertung ein Signal bei dem mit pRc/CMV-PTN transfizierten SW13-Zellen, nicht aber bei den wt-Zellen bzw. ALK-transfizierten Zellen. Die Untersuchung der PTN-Expression mittels der RT-PCR-Methode bestätigte das Ergebnis aus dem Northern Blot.

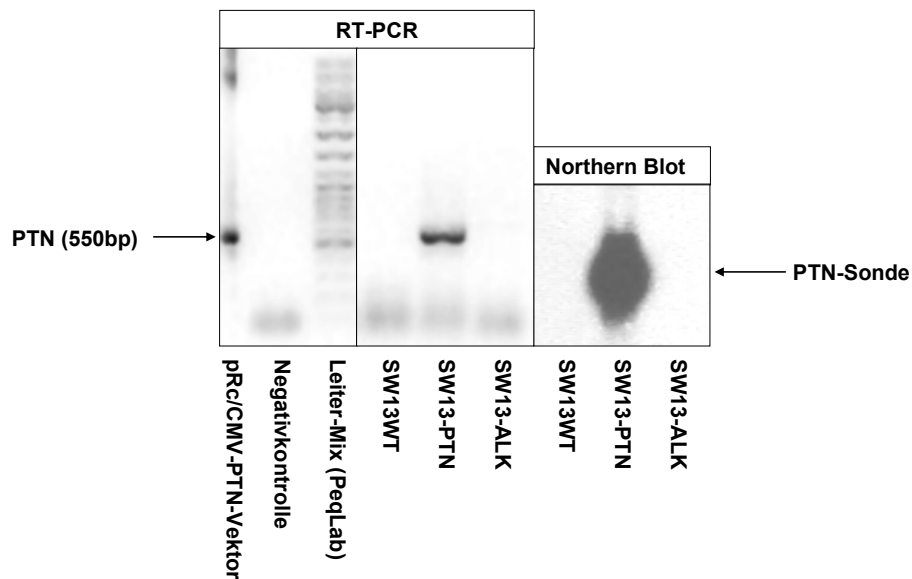


Abbildung 4.6 – Nachweis der rekombinanten PTN-Expression in SW13-PTN-Zellen (RT-PCR und Northern Blot)

4.2.2 PTN-Reinigung

Affinitätsreinigung mit Heparin-Sepharose

Nach der Bestätigung der PTN-Expression auf RNA-Ebene erfolgte die Reinigung dieses Wachstumsfaktors. PTN ist ein löslicher, heparin-bindender Wachstumsfaktor und wird nach der Translation von den Zellen ins Medium sezerniert. Das konditionierte Medium aus den Zellkulturflaschen wurde gesammelt und das darin enthaltene PTN isoliert. Die Reinigung erfolgte mittels der Heparin-Affinitäts-Chromatographie, die eine spezifische Aufreinigung heparin-bindender Proteine des Mediums ermöglicht. Die nach der Elution gewonnenen Fraktionen wurden anschließend im Western Blot-Verfahren mit Hilfe eines anti-hPTN-Antikörpers (R&D) untersucht. Neben dem PTN-konditionierten Medium der SW13-PTN-Zellen wurde zu Kontrollzwecken noch das SW13-wt-Medium gesammelt. In diesem Medium sollte erwartungsgemäß kein PTN vorkommen. Um dies sicherzustellen und zwecks späterer Kontrollen wurde es jedoch unter gleichen Bedingungen aufgereinigt, um später unspezifische Effekte anderer potentiell Heparin-bindender Wachstumsfaktoren auszuschließen. Die Auswertung des Western Blots zeigte in den ersten drei entnommenen Eluatfraktionen (F1 bis F3) eine Bande auf der erwarteten Höhe von 18kDa. Das aufgereinigte Kontrollmedium der wt-

Zellen enthielt kein PTN. Anschließend wurden sämtliche Fraktionen aus der jeweiligen Zelllinie vereinigt, in Centricon-Röhrchen eingengt und mit Phosphat-Puffer umgepuffert, um die aus dem Elutionspuffer stammenden Salz-Ionen zu entfernen.

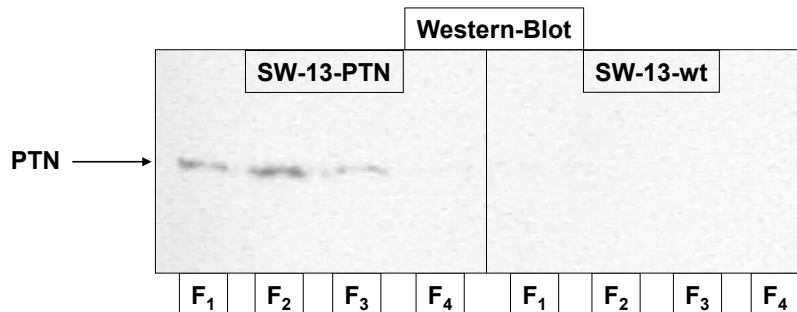


Abbildung 4.7 – Nachweis von PTN in Fraktionen aus der Heparin-Affinitäts-Reinigung mittels Western Blots

Konzentrationsmessung des gereinigten PTN im ELISA

Die PTN-Konzentration der aufgereinigten Proben wurde im ELISA vermessen. Die durchschnittliche Konzentration von PTN lag bei ca. 150 ng/μl und ermöglichte eine weitere Benutzung bei Stimulationsstudien. In den Kontrollproben lag kein PTN vor.

4.2.3 Auswirkungen auf das Wachstum von Tumorzellen *in vitro*

Proliferationsassays mit rekombinantem PTN

Die Untersuchung der PTN-Stimulierbarkeit der stabilen Tumorzelllinien erfolgte in Zellkulturexperimenten. Um die Auswirkung von Pleiotrophin auf das Tumorstadium zu untersuchen, wurden Wachstumsassays durchgeführt, bei denen die Zellen mit PTN bzw. mit der PTN-freien Kontrollprobe aus den wt-Zellen behandelt wurden. Die Bioaktivität des rekombinant hergestellten PTN wurde zunächst in der Kolonkarzinom-Zelllinie Lovo getestet (siehe Abb. 4.8). Diese Zellen exprimieren zwar eigenes PTN, im Rahmen dieses Versuchs konnten sie jedoch mit exogen zugeführtem PTN in ihrem Wachstum stimuliert werden. Die Erhöhung der Proliferationsrate ist Dosis-abhängig und manifestierte sich bereits bei 150 ng PTN pro Well in 6-Well-Platten. Eine Zugabe von 800 ng PTN/Well bewirkte eine weitere Wachstumssteigerung, die jedoch nicht direkt proportional zur Menge des eingesetzten PTN stand, da hier

höchstwahrscheinlich die Sättigungsgrenze der Rezeptoren erreicht wurde. Dieses Experiment zeigt, dass das gereinigte, rekombinante PTN aus den SW13-Zellen bioaktiv ist und durch exogene Zugabe zum Medium die Proliferationsgeschwindigkeit der Tumorzellen beschleunigen kann.

Zur Bestätigung der biologischen Wirkung des rekombinant hergestellten PTN wurde zusätzlich die Glioblastom-Zelllinie U87MG im Rahmen eines Wachstumsassays untersucht (siehe Abb. 4.9). Die Zellen wurden ebenfalls in eine 96-Well-Platte eingesät und mit PTN-haltigem Medium kultiviert. Es wurden entsprechend 0, 20ng und 200ng PTN pro Well pipettiert und die Ermittlung der Proliferationsrate erfolgte mit Hilfe des WST-1-Reagenz. Das während des Experiments benutzte Medium enthielt 0% bzw. 2% FCS, um die Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit besser herausarbeiten zu können.

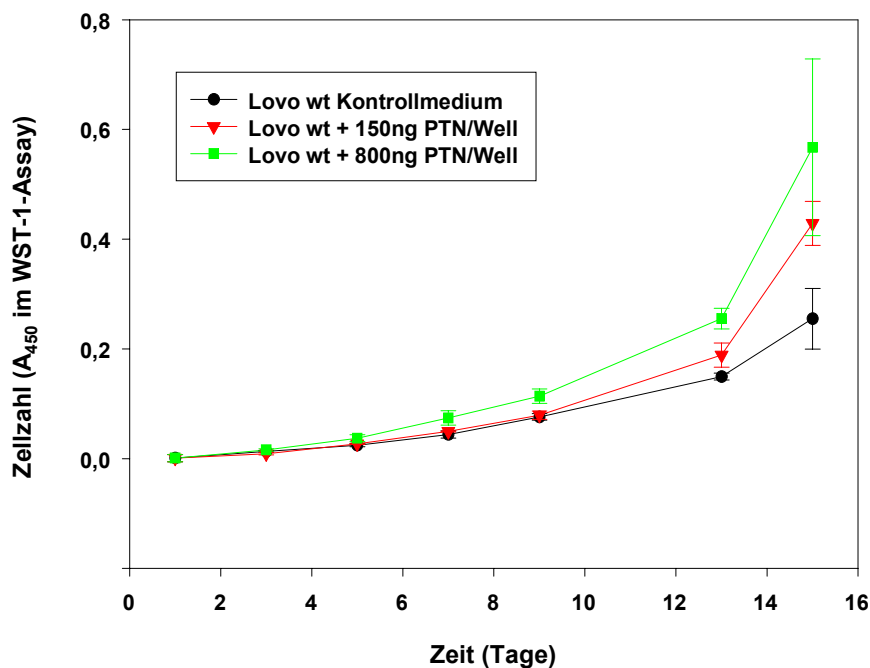


Abbildung 4.8 – PTN-Stimulation von Lovo-Zellen (WST-1-Proliferationsassay)

Die U87MG-Zellen wuchsen im serumfreien Medium unstimuliert nur sehr langsam und bildeten vorwiegend lange, schmale Zellen. Das folgende Diagramm stellt eine Endpunktmessung nach 7 Tagen Inkubation dar und enthält Abbildungen der entsprechend stimulierten Zellen. Bereits bei einer Konzentration von 0,2 ng PTN/ μ l

Medium konnte man eine Wachstumsstimulation feststellen, die bei 2 ng PTN/ μ l noch zunimmt. Die Zellen bildeten erst bei dieser PTN-Konzentration ein zusammenhängendes Geflecht und die Absorption im WST-Assay betrug ca. 60 % mehr als bei unstimulierten Zellen. Bei der PTN-Stimulation im serumhaltigen Medium (2%) sah das Ergebnis ähnlich aus bis auf die höheren absoluten Zelldichten bei allen Gruppen. Der PTN-Effekt war prozentual gesehen etwas stärker als beim serumfreien Versuchsaufbau (ca. 80%) und war ebenfalls konzentrationsabhängig. Die Zellen bildeten schon bei der niedrigeren PTN-Konzentration ein zusammenhängendes Geflecht und waren breiter als unstimulierte Zellen.

Anhand der obigen Studien lässt sich eindeutig die stimulatorische Wirkung von PTN auf kontaktabhängiges Wachstum von stabilen Tumorzelllinien bestätigen. Das in SW-13-Zellen rekombinant hergestellte PTN ist bereits in sehr niedrigen Konzentrationen bioaktiv und führt zu einer dosisabhängigen Proliferationssteigerung.

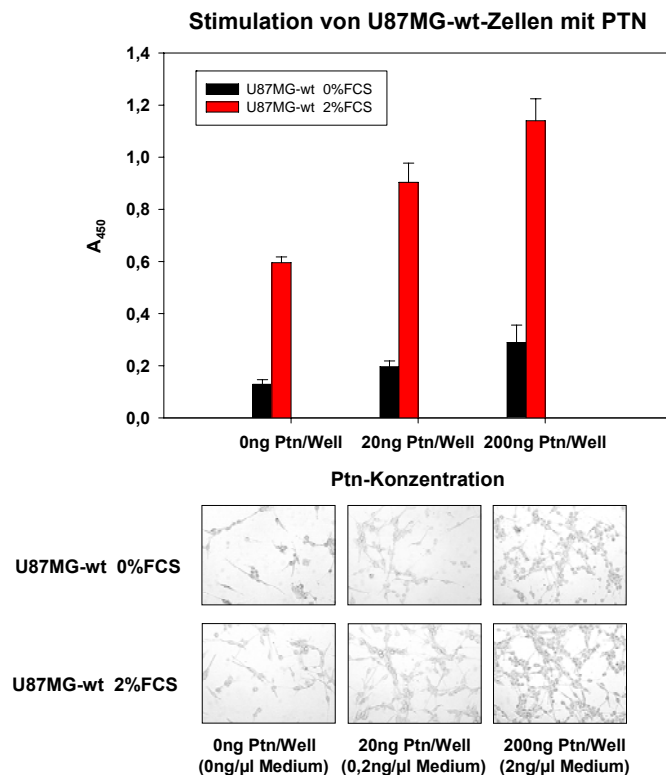


Abbildung 4.9 – PTN-Stimulation von U87MG-Zellen (WST-1-Proliferationsassay)

Weichagarassays mit rekombinantem PTN

Für die weitere Untersuchung der Funktion von PTN beim Tumorwachstum wurde der so genannte Weichagarassay angewandt. Diese Methode ermöglicht kontaktunabhängiges Wachstum der Tumorzellen und spiegelt besser die *in vivo*-Situation im Gewebe wider. Die Zellen wachsen im Weichagar in Form von Kolonien in einer Agarosematrix. Der Weichagarassay stellt eine weiterführende Möglichkeit zur Untersuchung der Veränderung des Wachstums und der Tumorigenität von Zelllinien, die entsprechend behandelt wurden.

Die Auswirkung des rekombinant hergestellten PTN auf die Kolonienbildung im Weichagar wurde zunächst bei der Kolonkarzinom-Zelllinie Lovo untersucht. Der zum Ansetzen des Weichagars benutzten Zellsuspension wurden 2,6 µg PTN/Well bzw. ein entsprechendes Volumen der PTN-freien Kontrollfraktion bzw. des Phosphat-Puffers zugesetzt. Der Phosphat-Puffer diente bei der Aufreinigung von PTN zum Umpuffern der eingeeengten Proben benutzt und fungierte bei diesem Experiment als weitere Kontrolle, ergänzend zur SW13-wt-Fraktion. Nach der zweiwöchigen Inkubation der Platten im Brutschrank wurden Kolonien ab einer zu Beginn der Auswertung festgelegten Größe („cut off“) gezählt und in Form eines Balkendiagramms aufgetragen. Der Weichagarassay bestätigte das Ergebnis des Proliferationsassays. Die mit PTN stimulierten Lovo-Zellen bildeten größere Kolonien aus als die Kontrollgruppe. Aufgrund des Ausschlusses kleinerer Kolonien bei der Zählung ergab das eine höhere Kolonienzahl bei stimulierten Zellen. Die Zunahme der betrug ca. 70% verglichen mit unstimulierten Zellen, die sich ihrerseits nicht zwischen Phosphat-Puffer und Kontrollfraktion (SW13-wt-Eluat) unterschieden.

Neben dem in SW13-PTN rekombinant hergestellten PTN wurde ein kommerziell erhältliches, rekombinantes PTN (Fa. R&D) im Hinblick auf die wachstumsstimulierende Funktion untersucht. Zu diesem Zweck wurden die SW13-wt Zellen gewählt, da sie kein endogenes PTN besitzen. Es ist jedoch bekannt, dass diese Nebennierenkarzinom-Zelllinie in geringen Mengen den ALK-Rezeptor exprimiert (siehe Kap.3.1.2) und damit potentiell PTN-stimulierbar ist. Die SW13-Zellen bilden unstimuliert kaum Kolonien im Weichagar und eigneten sich optimal zur Untersuchung des rhPTN.

Zur im Weichagarassay verwendeten Zellsuspension wurden jeweils 10 µg rhPTN / Well bzw. das gleiche Volumen an PBS-Puffer hinzugefügt. Nach einer zweiwöchigen Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien mit Hilfe eines Zähllokulars von mehreren Beobachtern gezählt und ausgewertet. Wie aus dem Balkendiagramm ersichtlich, bildete die mit rhPTN stimulierte Versuchsgruppe mehr an größeren Kolonien aus als die unbehandelten wt-Zellen. Selbst bei einer relativ niedrig angesetzten Zählausschlussgrenze gab es in der Kontrollgruppe kaum Kolonien.

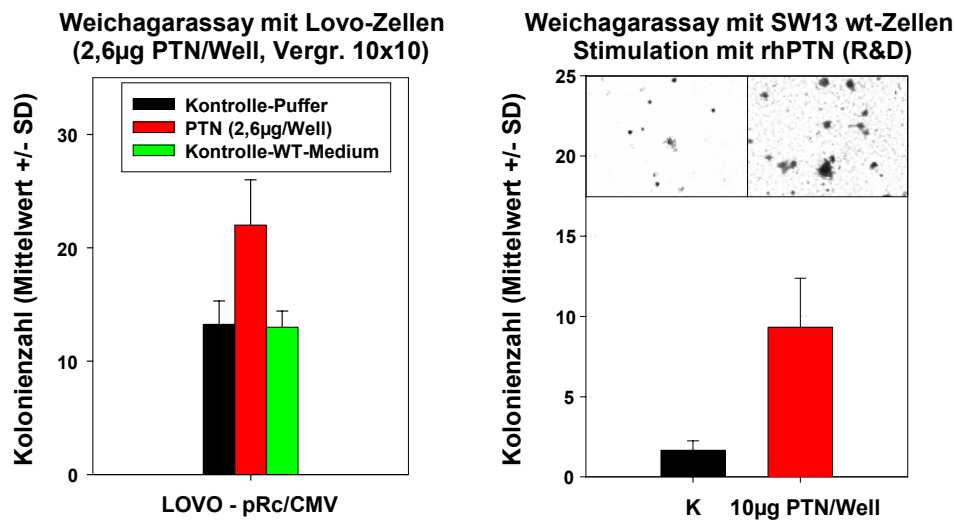


Abbildung 4.10 – links: Stimulation von Lovo-Zellen im Weichagar mit rekombinanten PTN aus eigener Herstellung; rechts: Stimulation von SW13-Zellen im Weichagar mit kommerziell erhältlichem, rekombinanten PTN

4.2.4 Studien mit PTN aus Glioblastomzellen

Neben dem aus SW13-PTN-Zellen gewonnenen, rekombinanten PTN sowie dem kommerziell erhältlichen rhPTN wurde noch das native PTN aus endogen PTN-exprimierenden U87MG-Zellen untersucht. Ähnlich wie im Falle der rekombinanten PTN-exprimierenden SW13-PTN Zellen wurde das konditionierte Medium gesammelt und mit Hilfe der Heparin-Sepharose gereinigt. Die so gewonnene Fraktion wurde im PTN-ELISA vermessen und in Proliferationsassays und Weichagarassays eingesetzt.

Gereinigtes, konditioniertes Medium aus U87MG-Zellen (wt und Leervektortransfizierte-Zellen) wurde zur Stimulation von SW13-Zellen benutzt um die

Wirkung auf deren Proliferationsverhalten zu untersuchen. Die Auswertung der Proliferationsassays lässt eine Wachstumsstimulation der behandelten Zellen gegenüber der Kontroll-Gruppe erkennen. Es wurde ein geringer Unterschied zwischen der U87MG -wt und -pRc/CMV-Fraktion beobachtet, die Stimulationswirkung war jedoch in beiden Fällen erkennbar.

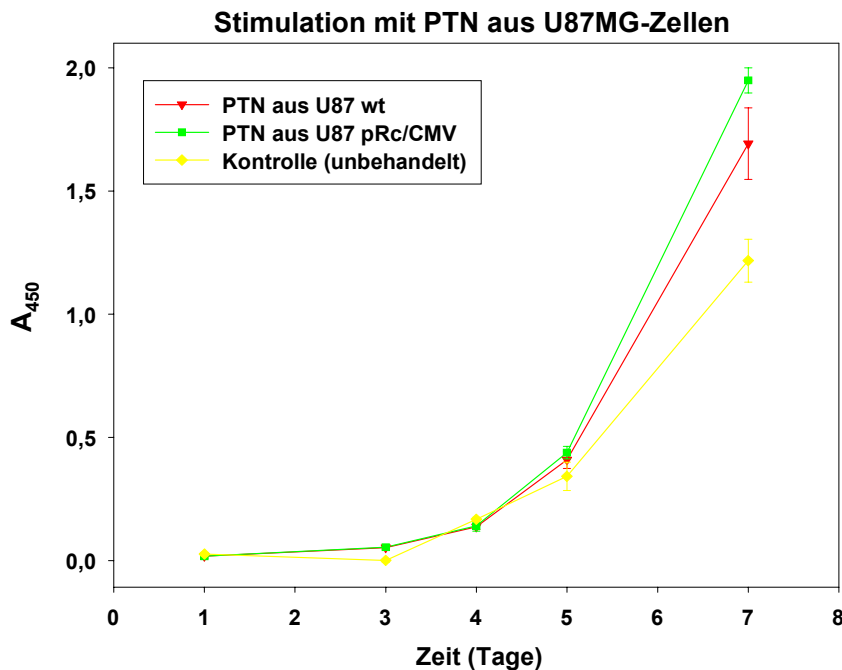


Abbildung 4.11 – Stimulation von SW13-Zellen mit nativem PTN aus U87MG-Zellen, 2% FCS im Medium, 50ng PTN pro Well (WST-1-Proliferationsassay)

Weichagarassays mit nativem PTN

In diesem Versuch wurde die R_z-vermittelte Abnahme der PTN-Expression auf indirekte Weise in einem Weichagarassay untersucht. Das native, endogen exprimierte PTN wurde aus konditioniertem Medium verschiedener U87MG-Linien gereinigt: wt, pRc/CMV, PTN-Rz66 und PTN-Rz261 (siehe Kapitel 3.3). Die gereinigten Fraktionen wurden anschließend in Weichagarassays mit SW13-Zellen eingesetzt. Nach einer mehrwöchigen Inkubation erfolgte die Zählung von Kolonien mit einem Durchmesser von über 50 µm. Wie aus der Abbildung ersichtlich, bildeten die mit den aus U87MG-wt- und U87MG-pRc/CMV-Zellen gereinigten PTN-Fraktionen behandelten SW13-Zellen die meisten Kolonien aus. Die Kolonienzahl der Zellen, die mit PTN aus U87MG-PTNRz66- und U87MG-PTNRz261-Zellen behandelt wurden, war um ca. 50% niedriger. Wenn man bedenkt, dass unstimulierte SW13-Zellen beinahe keine

Kolonienbildung im Weichagar zeigen, deutet dieses Ergebnis auf eine geringe PTN-Restmenge in den Rz-Fractionen hin.

Die anschließende Vermessung der eingesetzten Fractionen im PTN-ELISA ergab einen direkten Zusammenhang zwischen der PTN-Konzentration im Eluat und der Stimulation der Kolonienbildung bei SW13-Zellen. Das Resultat beider Experimente stimmte exakt überein und bestätigte die Funktion von PTN beim Tumorwachstum und bei der Kolonienbildung.

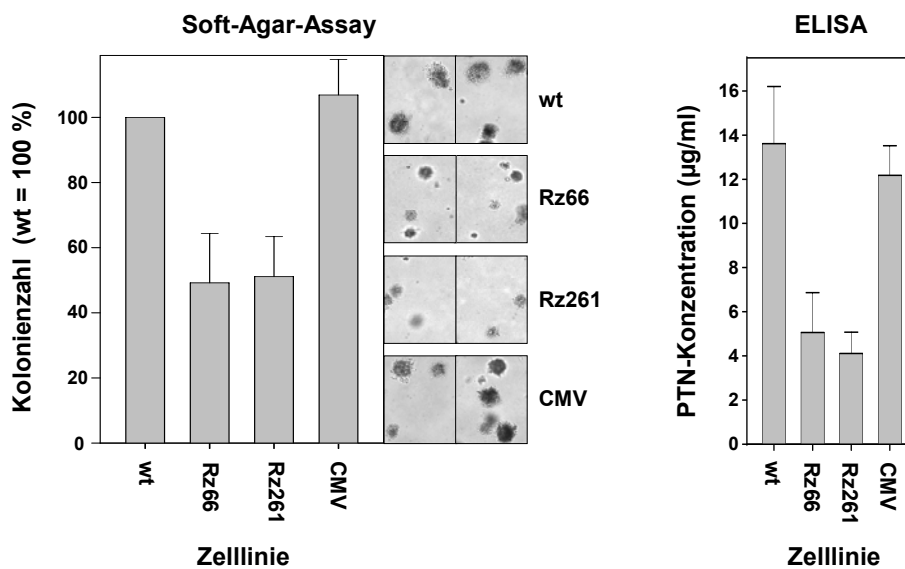


Abbildung 4.12 – links: Stimulation von SW13-Zellen im Weichagarassay mit PTN aus U87MG-Zellen; rechts: Konzentrationsmessung des eingesetzten PTN im ELISA

4.3 PTN-Einzeltargeting

4.3.1 Stabile Transfektion mit Ribozymen gegen PTN

Für Studien über die Funktion von PTN beim Tumorwachstum wurden neben dem exogen zugeführten PTN zur Untersuchung der Überschuss-Effekte Zelllinien mit konstant vermindertem PTN-Level hergestellt. Als Werkzeug zur Verminderung der PTN-Expression kamen Ribozyme zum Einsatz. Hammerkopf-Ribozyme stellen katalytische RNA-Moleküle dar mit einer Hammerkopf-Struktur, die für die katalytische Spaltung der mRNA verantwortlich ist, sowie mit zwei linearen Bereichen, die für die Erkennung der Ziel-mRNA zuständig sind. Es wurden DNA-Konstrukte

hergestellt, bei denen Ribozym-kodierende Sequenzen mit HindIII und NotI in den pRc/CMV-Vektor kloniert worden sind. Diese Vektoren ermöglichen also eine konstitutive Expression von Ribozymen gegen die mRNA von PTN. Die beiden Konstrukte tragen die Bezeichnungen PTN-Rz66 und PTN-Rz261 entsprechen der Position im PTN-Gen, die von den Ribozymen erkannt wird. Darüber hinaus wurde zu Kontrollzwecken der Leervektor eingesetzt. Mit diesen Expressionvektoren wurden Tumorzelllinien (U87MG, T98G, Lovo, NCCIT) transfiziert und anschließend mit G418 selektioniert. Jede Tumorzelllinie wurde mit beiden Rz-Konstrukten transfiziert und als massentransfizierte Zelllinie bei den *in vitro* und *in vivo*-Experimenten eingesetzt (außer T98G-PTN-Rz261 – diese Zelllinie wurde zusätzlich klonal selektioniert).

4.3.2 Nachweis der Ribozym-Expression

Der Nachweis der Rz-Expression in den stabil transfizierten Zellen (U87MG-PTN-Rz66 und U87MG-PTN-Rz261) erfolgte mit Hilfe der RT-PCR und des Southern Blots. Die gereinigte Gesamt-mRNA aus diesen Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe von Rz-flankierenden T7 und SP6-Primern amplifiziert. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nylon-Membran und eine Inkubation mit radioaktiven Rz-Sonden (PTN-Rz66 und PTN-Rz261). Die autoradiographische Auswertung dieses Experiments zeigte ein Rz-Signal bei beiden mit Rz-Konstrukten transfizierten Zelllinien. Dieses Ergebnis belegt damit die Rz-Expression in stabil-transfizierten Zellen und wurde exemplarisch nur für die U87MG-Zellen durchgeführt (siehe Abb. 4.13).

4.3.3 Analytik des Expressionslevels von PTN

Northern Blot

Die mit Ribozymen stabil transfizierten Zelllinien wurden im Hinblick auf den PTN-Expressionslevel untersucht. Die Gesamt-RNA aus diesen Zellen wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und mit PTN- und 18S-Sonden inkubiert. Die anschließende Auswertung mit Hilfe eines Phosphorimagers ermöglichte die Berechnung der PTN/18S-Ratio, die in Form eines Balkendiagramms aufgetragen wurde. Der daraus ermittelte PTN-Expressionslevel bestätigte eine PTN-

Abnahme bei PTN-Rz-transfizierten Zelllinien. Die U87MG-Zellen zeigten eine Verminderung der PTN-Expression um 60% (Rz66) bzw. um 80% (Rz261) bei massentransfizierten Zellen. Im Falle der T98G-Zelllinie war die PTN-Herunterregulierung bei massentransfizierten Zellen nicht so effizient (Rz66 – 20% Abnahme, Rz261 – 60% Abnahme) und es wurden klonal selektionierte Zelllinien hergestellt. Hier betrug die PTN-Restexpression nur noch 5 bis 40% des Referenzwertes der wt- bzw. pRc/CMV-Zellen.

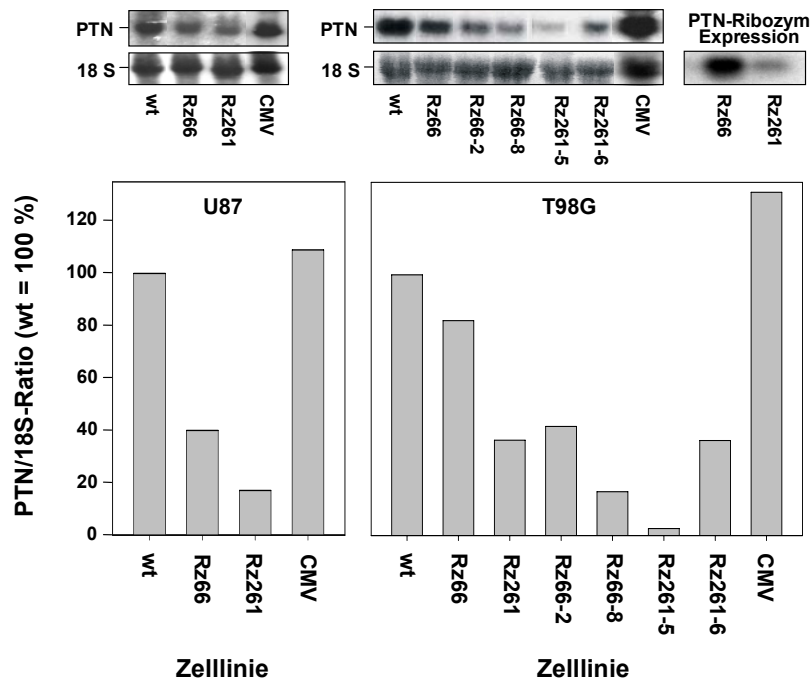


Abbildung 4.13 – PTN-Einzeltargeting: Nachweis der PTN-Herunterregulierung im Northern Blot (normiert auf den wt); oben rechts: RT-PCR zum Nachweis der Rz-Expression in transfizierten Zellen

Quantitative PCR

Neben der Quantifizierung mittels Northern Blots erfolgten die weiteren Untersuchungen der PTN-Expression mit Hilfe der quantitativen PCR. Die aus Gesamt-mRNA umgeschriebene cDNA wurde mit spezifischen Primern für PTN und Actin amplifiziert und ausgewertet. Bei dieser PTN-Quantifizierung der U87MG-Zellen wurden Daten aus mehreren Experimenten auf den Leervektor normiert und in Form eines Balkendiagramms aufgetragen. Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten eine PTN-Abnahme auf RNA-Ebene bei Rz-transfizierten Zellen. Die Rest-Expression von

PTN lag bei unter 30% der Expression der Kontrollzellen (wt und pRc/CMV) und bestätigte das Resultat des Northern Blots.

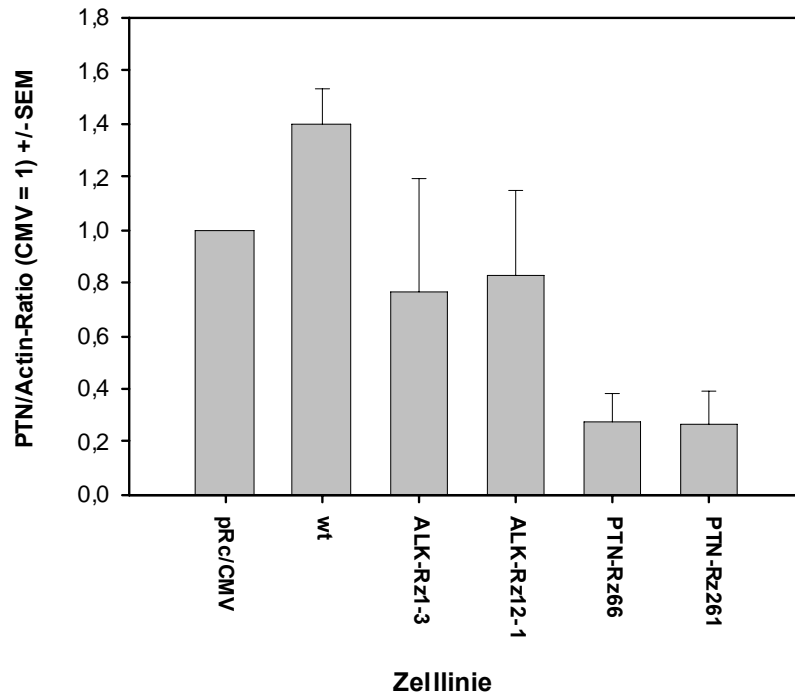


Abbildung 4.14 – PTN-Einzeltargeting – Quantifizierung des PTN-Levels in U87MG-Zellen mit quantitativer RT-PCR

PTN-ELISA

Um die Rz-vermittelte PTN-Herunterregulierung auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden konditionierte Medien der entsprechenden Zelllinien im PTN-ELISA vermessen. Über eine Standardreihe (rhPTN von R&D) konnte die genaue PTN-Konzentration im jeweiligen Medium ermittelt werden. Daten aus mehreren unabhängigen Experimenten wurden auf den wt-Wert normiert und als Balkendiagramm aufgetragen. Anhand dieses Diagramms erkennt man eine direkte Korrelation zwischen der PTN-Menge auf RNA und auf Protein-Ebene. Durch Verminderung der PTN-mRNA kommt es zur Abnahme der PTN-Sekretion ins Medium. Sowohl bei den U87MG-Zellen wie auch bei den T98G-Zellen sieht man eine 40% (Rz66) bis über 60% Abnahme der PTN-Konzentration im konditionierten Medium. Die Leervektor-transfizierten Zellen exprimieren die ursprüngliche PTN-Menge, was einen unspezifischen Effekt des Plasmids ausschließt.

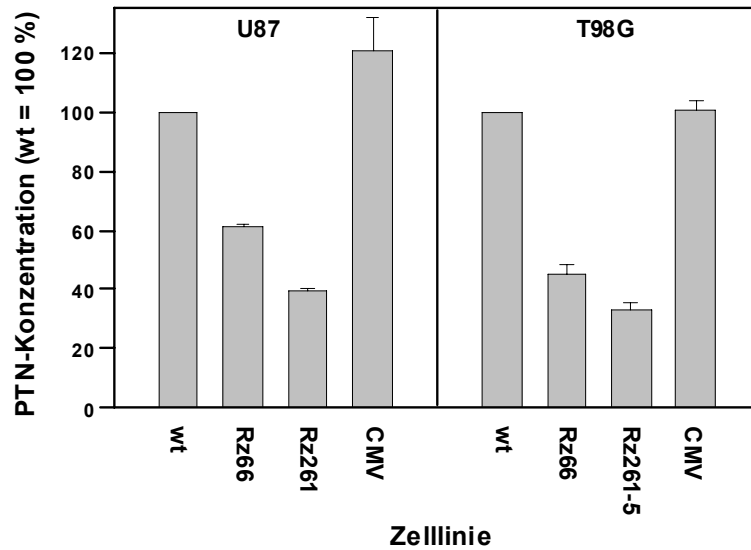


Abbildung 4.15 – PTN-Einzeltargeting – Messung der PTN-Konzentration im konditioniertem Medium (ELISA)

4.3.4 Einfluss der PTN-Expression auf die Zellproliferation *in vitro*

Die konstitutive Verminderung des PTN-Levels ermöglichte eine Untersuchung des PTN-Einflusses auf die Proliferationsgeschwindigkeit, Fähigkeit zur Kolonienbildung und auf das Tumorstadium *in vivo*. Die mit anti-PTN-Ribozymen transfizierten Zelllinien sowie wt- und Leervektorzellen wurden in folgenden *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten untersucht.

Proliferationsassays

Der Einfluss von PTN auf die Proliferationsrate der jeweiligen Tumorzelllinie wurde mit Hilfe des WST-1-Proliferationsassays durchgeführt. Die daraus ermittelten Werte wurden anschließend als Wachstumskurven aufgetragen. Mit Hilfe dieser Methode wurden U87MG-, Lovo- und NCCIT-Zellen im Hinblick auf ihre Proliferationsrate abhängig vom PTN-Level untersucht (Abb.4.16).

Das Ergebnis dieser Experimente zeigt eine Wachstumsverschlechterung der Zelllinien mit verminderter PTN-Expression. Im Falle der U87MG-Zellen erkennt man bereits nach 4 Tagen Inkubation einen Unterschied zwischen den wt-Zellen und den beiden Rz-

transfizierten Zelllinien. Nach 9 Tagen divergieren die beiden Rz-Kurven auseinander und zeigen einen etwas intensiveren Effekt bei den Rz261-Zellen.

Die Kolonkarzinom-Zelllinie Lovo scheint ähnlich wie die Glioblastom-Zellen bei ihrem Wachstum auf PTN angewiesen zu sein. Als Kontrolle dienten bei diesen Experimenten die wt-Zellen, deren gesamter Kurvenverlauf auf eine höhere Proliferationsrate hindeutet. Man sieht ebenfalls einen geringfügigen Unterschied zwischen beiden Rz-Konstrukten, von denen der Rz261 wieder einen etwas größeren Proliferationsnachteil bewirkt.

Als dritte Zelllinie wurden die Hodenkarzinomzellen NCCIT untersucht. Hier erkennt man ebenfalls auch eine Verlangsamung der kontaktabhängigen Proliferation. Die PTN-reduzierten Zellen wuchsen langsamer als die wt-Zellen und wieder schien das Ribozym PTN-Rz261 einen etwas stärkeren Effekt auf die Proliferation auszuüben. Am Tag 9 flacht die wt-Kurve wieder ab, was mit der Medium-bedingten Verschlechterung der Wachstumsbedingungen zusammenhängt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der PTN-Einfluss bereits beim Kontakt-abhängigen Wachstum erkennbar ist und dass die konstitutive Verminderung der PTN-Expression direkt proportional zur Proliferationsrate der Zellen steht.

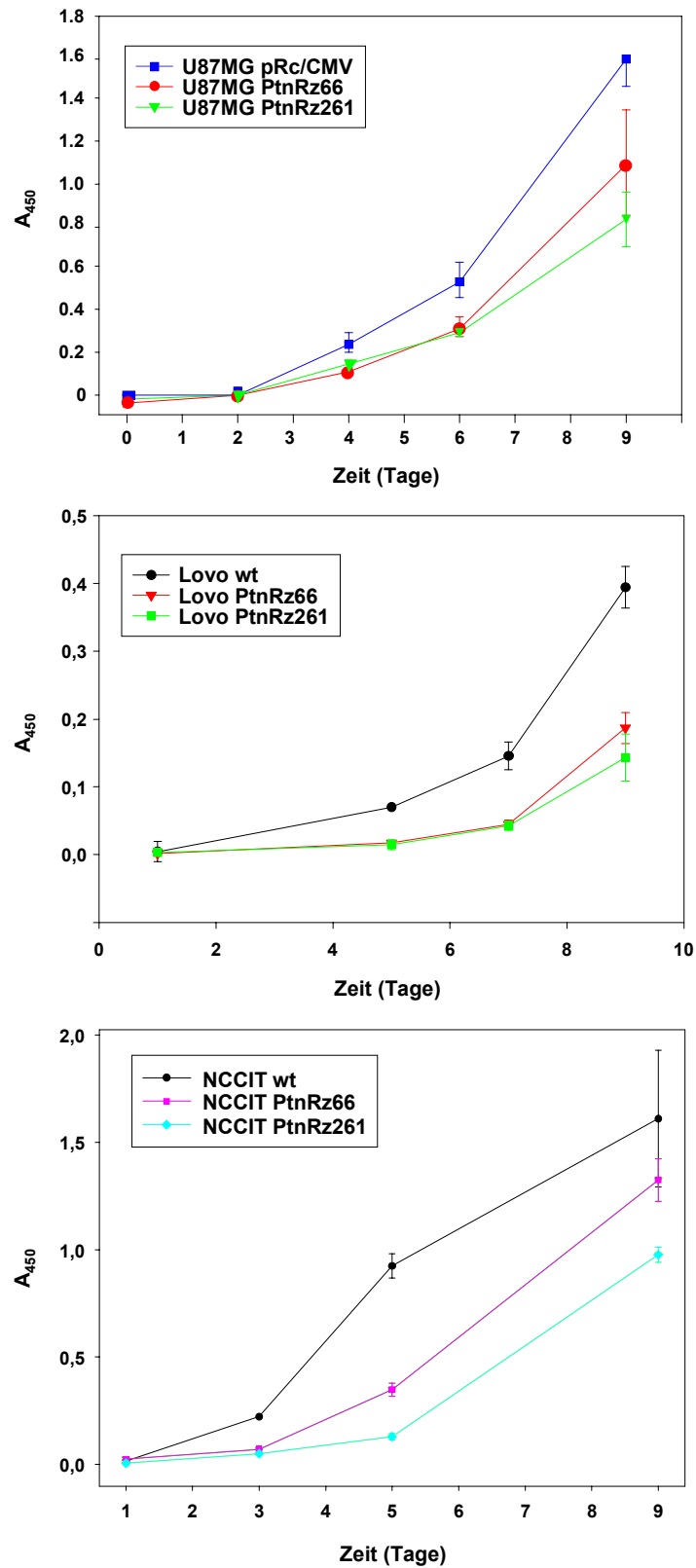


Abbildung 4.16 – PTN-Einzeltargeting – Proliferationsassays mit U87MG-, Lovo- und NCCIT-Zellen (WST-1)

Weichagarassays

Bei diesen Experimenten wurden die im Agar aus Einzelzellen entstandenen Kolonien ab einer bestimmten Ausschlussgröße gezählt und in Form eines Balkendiagramms ausgewertet. Wie beim WST-1-Assay wurden auch hier die Zelllinien U87MG, Lovo und NCCIT untersucht (Abb. 4.17).

Die U87-Zellen zeigten nach PTN-Herunterregulierung eine Abnahme der Fähigkeit zur Kolonienbildung im Weichagar. Die mit Rz66-transfizierten Zellen bildeten über 60% weniger Kolonien und die Rz261-Zellen sogar um 85% weniger Kolonien als die Kontroll-Zelllinien wt und pRc/CMV, die ihrerseits gleich viele Kolonien aufwiesen. Die mit Lovo-Zellen durchgeführten Weichagarversuche zeigten eine ähnliche Rz-vermittelte Auswirkung auf die Kolonienbildung. Die beiden Rz-Zelllinien wiesen nur 25% (Rz66) bzw. 20% (Rz261) der Kolonienzahl des Wildtyps auf. Insgesamt waren die Kolonien etwas kleiner als die von U87MG-Zellen, was mit der Morphologie der Zellen zusammenhängt. Die zuletzt aufgeführten NCCIT-Zellen ergänzen die Versuchsreihe, die die Ergebnisse aus dem WST-1-Assay bestätigt. Die hier als Referenz-Zelllinie eingesetzten pRc/CMV-Zellen wuchsen im Weichagar schneller als die PTN-depletierten Zelllinien und bildeten 60 – 90% mehr Kolonien aus. Die etwas bessere Wirkung des Rz261 bestätigte sich auch in diesem Versuch.

Mit dieser Methode konnten die Daten aus den Versuchen mit Kontakt-abhängigem Wachstum bekräftigt werden und untermauerten den Nachweis der wachstumsfördernden Funktion von PTN bei verschiedenen Tumorentitäten.

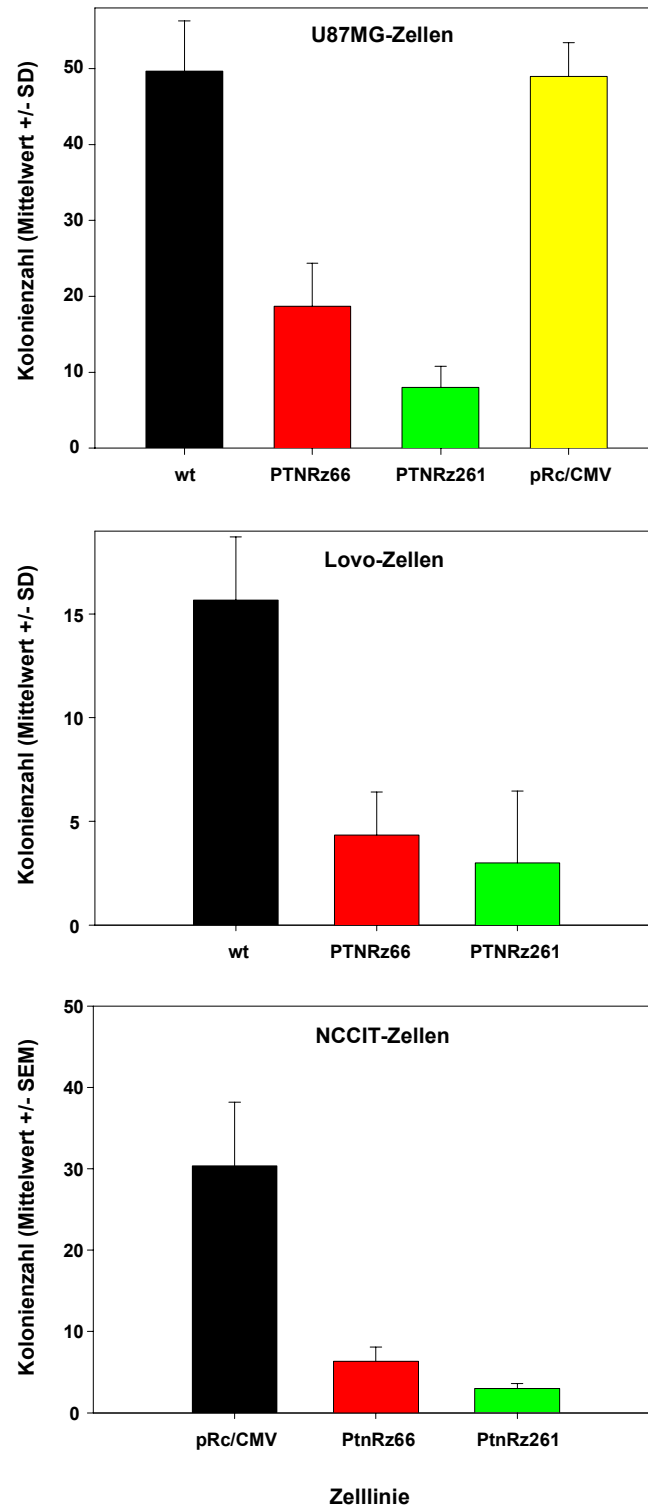


Abbildung 4.17 - PTN-Einzeltargeting – Weichagarassays mit U87MG-, Lovo- und NCCIT-Zellen (WST-1)

Wounding-Assays

Ergänzend zu den vorhergehenden Versuchen wurde die Fähigkeit der Tumorzellen untersucht, künstlich eingeführte Schnitten im Zellrasen wieder zu verschließen. Diese Experimente ermöglichten die Untersuchung der invasiven und migratorischen Eigenschaften von Tumorzellen abhängig von ihrem PTN-Level. Mit dieser Methode wurden die zwei Glioblastomlinien U87MG und T98G untersucht (Abb. 4.18). Nach dem Einführen der Schnitten bei den bereits bis zur Konfluenz kultivierten Zellen wurden die 6-Well-Platten weiter inkubiert und regelmäßig auf das Wiederverschließen untersucht. Mit Hilfe eines skalierten Okulars wurde die prozentuale Wiederbesetzung der Lücke festgehalten und graphisch ausgewertet. Die Kurven in beiden Graphen zeigen ein schnelleres Wiederverschließen der Schnitte durch Zellen mit unverändertem PTN-Level (wt und pRc/CMV). Diese Zellen besetzten im Falle der U87-Zelllinie bereits am Tag 9 (von 11) vollständig die Schnitte und am Tag 4 (von 5) bei der T98G-Zelllinie. Das schnellere Einwachsen der unbehandelten Zellen war während des gesamten Versuchsverlaufs sichtbar und spiegelte sich in den Kurven wider.

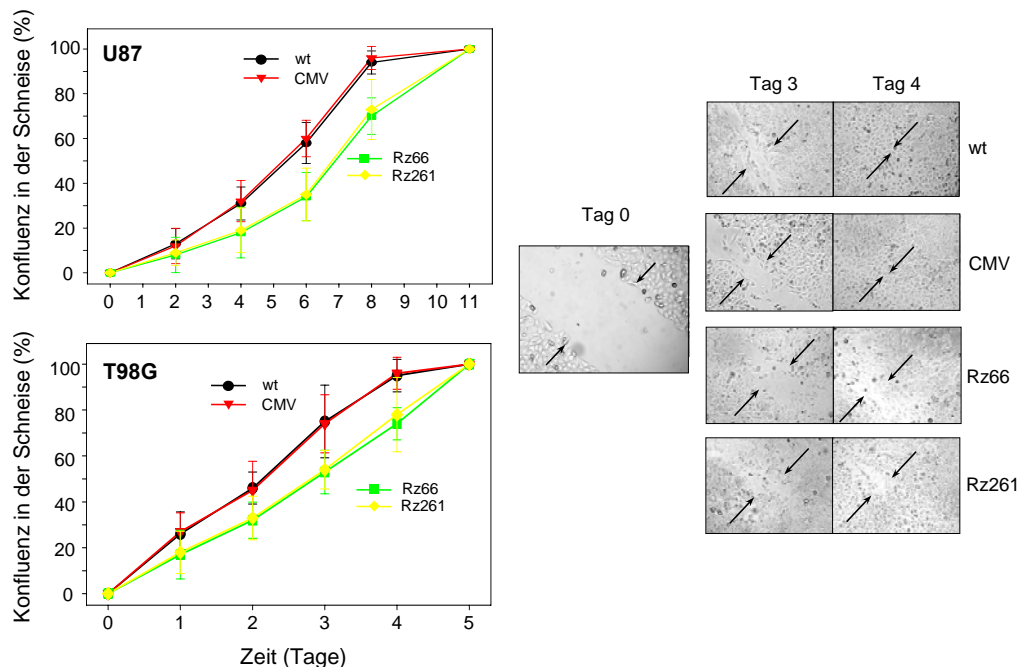


Abbildung 4.18 - PTN-Einzeltargeting – Wounding-Assay mit U87MG- und T98G-Zellen

PTN-Restimulation

Bei folgenden Experimenten wurde die Auswirkung der Zugabe von rekombinant hergestelltem PTN bei Zellen mit Rz-vermittelter PTN-Herunterregulierung untersucht. Als erste Zelllinie dienten T98G-Zellen, die jeweils mit einem leeren pRc/CMV-Vektor bzw. mit zwei verschiedenen pRc/CMV-basierten PTN-Rz-Konstrukten transfiziert worden sind. Die Leervektor-transfizierte Zelllinie fungierte hier als Referenz für die Zelllinien mit Rz-bedingt vermindertem PTN-Level. Sowohl die Kontrollgruppe wie auch die Rz-transfizierten Zellen wurden im Rahmen dieses Experiments mit der PTN-Fraktion bzw. mit einer PTN-freien Kontrollfraktion behandelt. Die PTN-Menge bei der behandelten Versuchsgruppe betrug 150 ng/Well. Im Falle der Leervektor-transfizierten Zellen wurde eine leichte Zunahme der Proliferationsgeschwindigkeit festgestellt. Die PTN-vermittelte Stimulation war jedoch stärker bei Zellen mit verminderter PTN-Expression (PTN-Rz66 und PTN-Rz261). Diese Zellen wuchsen unstimuliert langsamer als die Referenzgruppe (pRc/CMV), ihre Proliferationsgeschwindigkeit konnte jedoch durch PTN-Zugabe gesteigert werden. Die Rz66-Zellen zeigten hier sowohl unstimuliert, wie auch stimuliert ein etwas besseres Wachstumsverhalten als die Rz261-Zellen. Dieses Phänomen beruht auf der katalytischen Effizienz des jeweiligen Ribozyms beim PTN-Abbau und konnte ebenfalls bei der Analytik des PTN-Expressionslevels der Rz-transfizierten Zellen bestätigt werden.

Die U87MG-Zellen wurden als eine weitere Glioblastom-Zelllinie auf den PTN-Einfluss auf das Wachstum untersucht (siehe Abb.4.20). Ähnlich wie im Falle der T98G-Zellen wurde dem Medium gereinigtes, rekombinant hergestelltes PTN aus SW13-PTN (150 ng/Well) bzw. die Kontroll-Fraktion aus SW13-wt-Zellen zugeführt.

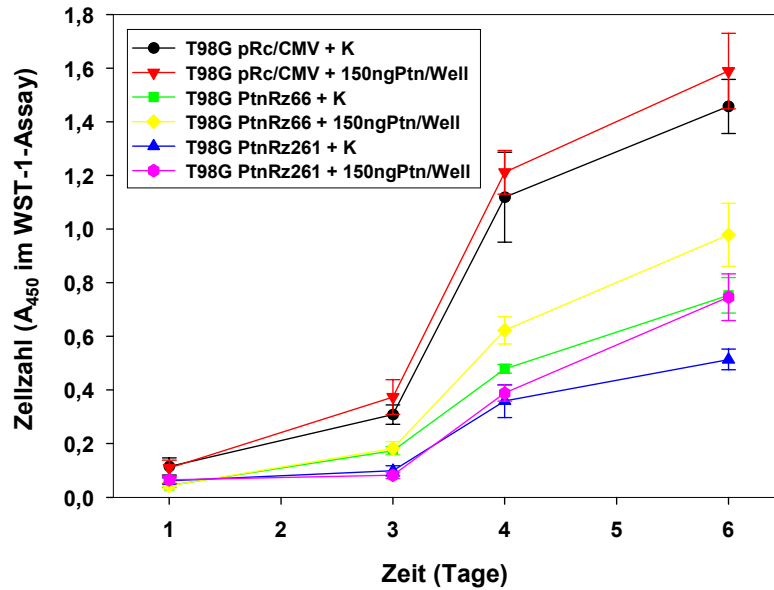


Abbildung 4.19 - PTN-Einzeltargeting – Restimulation der Proliferation von T98G-Zellen durch rekombinantes PTN aus SW13-PTN-Zellen (150ng PTN/Well); (WST-1-Proliferationsassay)

Die wt-Zellen zeigten nur eine geringfügige Stimulation der Proliferationsrate, was offensichtlich mit dem hohen Level der endogenen PTN-Expression korreliert. Die PTN-Rz-transfizierten Zellen wuchsen langsamer als die wt-Zellen und es konnte wieder, wie im Falle der T98G-Zellen, ein Unterschied zwischen den beiden Rz-Konstrukten festgestellt werden. Die Rz66-Zellen wuchsen unstimuliert zwar langsamer als die wt-Zellen, ihr Wachstum konnte jedoch nach PTN-Zugabe auf das Niveau der als Referenz dienenden wt-Zellen angeglichen werden. Die Rz261-Zellen zeigten das schlechteste Wachstumsverhalten und selbst nach der PTN-Stimulation erreichten sie nicht die Proliferationsrate der Referenzgruppe. Dieses Ergebnis deutet auf eine stärkere Rz-vermittelte PTN-Herunterregulierung bei den Rz261-Zellen, die durch PTN-Zugabe in obiger Konzentration nicht komplett kompensiert werden kann.

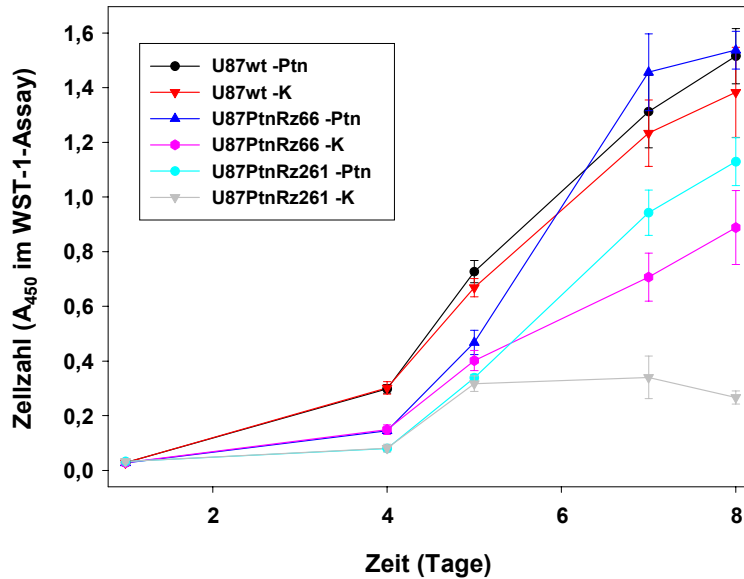


Abbildung 4.20 - PTN-Einzeltargeting – Restimulation der Proliferation von U87MG-Zellen durch rekombinantes PTN aus SW13-PTN-Zellen (150ng PTN/Well); (WST-1-Proliferationsassay)

4.3.5 Apoptose-Assays

Parallel zu den Wachstumsstudien mit PTN-reduzierten Zellen wurde die Apoptoserate der jeweiligen Konstrukte in einem Cell Death Detection ELISA gemessen. Dazu wurden die jeweiligen Zelllysate im Hinblick auf die Karyolyse immunchemisch untersucht. Während in T98G-Zellen überhaupt kein Unterschied in der Apoptoserate detektiert werden konnte (Daten nicht abgebildet), wurde im Falle der U87MG-Zellen eine leichte Zunahme der Apoptoserate nach PTN-Verminderung festgestellt. Die beiden Rz-Konstrukte zeigen jeweils eine Zunahme der Apoptoserate von ca. 40% (Rz66) bzw. ca. 50% (Rz261), der Effekt war jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant.

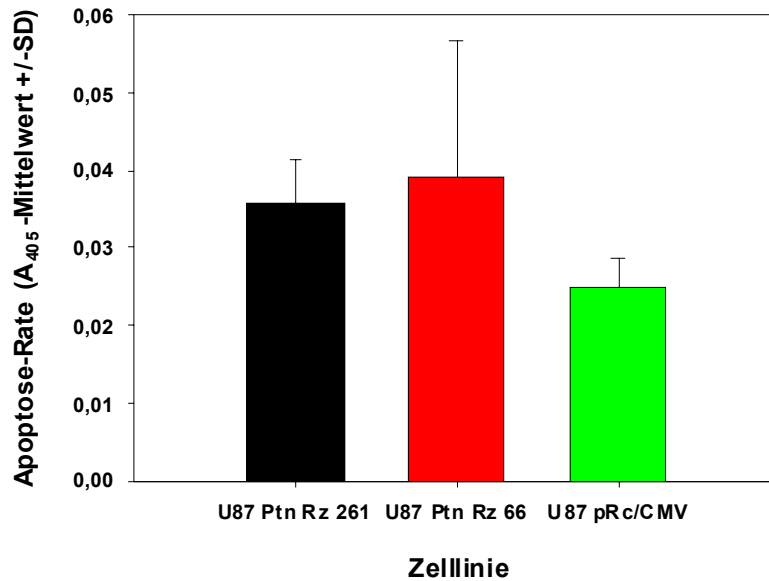


Abbildung 4.21 – Apoptose-ELISA mit U87MG-Lysaten

4.3.6 Einfluss der PTN-Expression auf die Zellproliferation *in vivo*

Mausexperimente

Die Zielsetzung der Tierstudien war die Überprüfung der Auswirkung von PTN auf das Wachstum von soliden Tumoren, ihr Angiogenese-Verhalten und Proliferation sowie die Messung der PTN-Konzentration in den Tumoren und im Mausblut. Zu diesem Zweck wurden U87MG-wt- bzw. PTN-Rz261-Zellen für subkutane Injektionen in athymischen Nacktmäusen eingesetzt. Aus den 2 Millionen Zellen pro Injektion entwickelten sich nach ca. einer Woche feste Tumoren, die dann in ein- bis zweitägigen Abständen gemessen wurden. Bereits nach einer Woche nach Beginn der Messung konnte ein Unterschied zwischen den wt- und Rz261-Tumoren festgestellt werden. Während die Rz261-Tumoren nur sehr langsam weiterwuchsen, beschleunigte sich das Wachstum der wt-Tumoren nach diesem Zeitpunkt und der Anstieg der Tumorgößen verlief exponentiell. Aufgrund des Erreichens der kritischen Tumorgöße bei der wt-Mausgruppe wurde das Experiment am Tag 29 der Messung abgebrochen und die Tumorgößen wurden in Form von Wachstumskurven aufgetragen. Das Ergebnis dieses Mausexperiments zeigt eindeutig eine Wachstumsverlangsamung von Tumoren mit verminderter PTN-Expression. Zur weiteren Analyse wurden die Tumoren anschließend

aus den Mäusen herauspräpariert und aufgeteilt. Eine Hälfte der Tumormasse wurde im flüssigen Stickstoff schockgefroren und die andere für Paraffin-fixierte Gewebeschnitte verwendet.

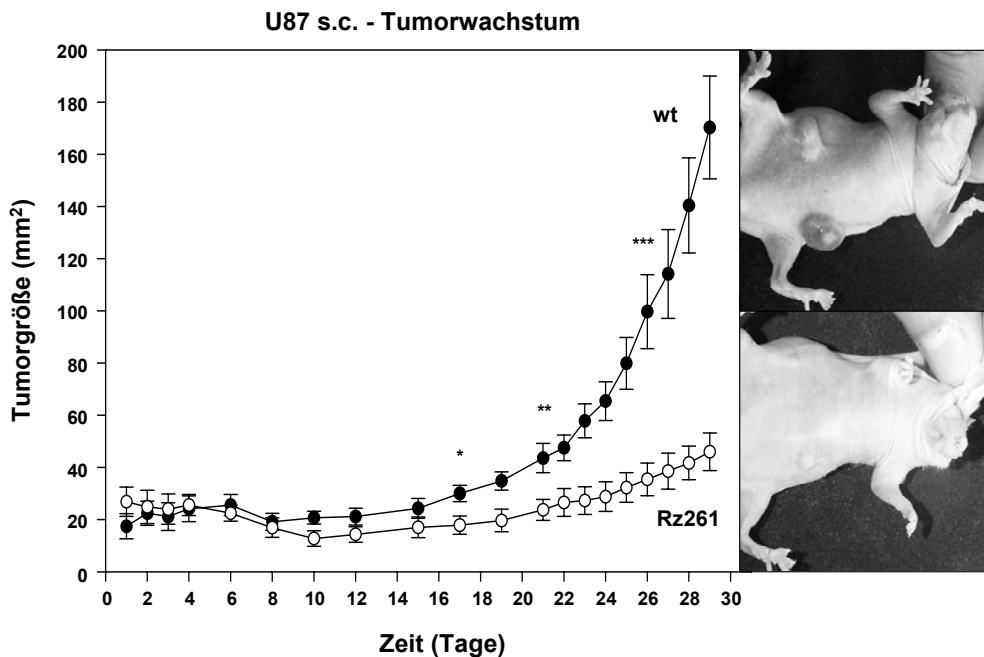


Abbildung 4.22 – PTN-Einzeltargeting - Mausexperiment mit s.c. U87MG-Tumoren; * $P < 0,05$; ** $P < 0,1$; *** $P < 0,001$

Tumor-Northern Blot

Um zu beweisen, dass die Verlangsamung des Tumorwachstums tatsächlich auf der Rz-vermittelten PTN-Herunterregulierung basiert, wurde die PTN-Konzentration in den Tumoren mit Hilfe des Northern Blots gemessen. Dazu wurde eine RNA-Aufreinigung aus einem Teil der Tumormasse durchgeführt. Anschließend erfolgten eine elektrophoretische Auftrennung sowie eine Hybridisierung mit einer PTN-Sonde. Die radiographische Auswertung ergab eine Verminderung des PTN-mRNA-Levels bei Rz261-Tumoren, das Ergebnis war jedoch nicht signifikant und musste mit einer weiteren Methode bestätigt werden (Abb. 4.23).

PTN-Konzentration im Blut

Aufgrund der Tatsache, dass PTN ein löslicher Wachstums- und Angiogenesefaktor ist und von den Tumoren ins Blut sezerniert wird, konnte die PTN-Konzentration im Mausblut gemessen werden. Das nach dem Töten der Mäuse entnommene Blut wurde zu diesem Zweck mittels des PTN-ELISA untersucht. Die Messung ergab einen

Unterschied in der PTN-Konzentration im Blut beider Mausgruppen. Das Blut der Mäuse mit den wt-Tumoren enthielt ca. 2,8 ng PTN/ml während das Blut der Mäuse mit den PTN-Rz261-Tumoren nur 1,5 ng PTN/ml aufwies. Damit konnte eine Korrelation zwischen der Tumorgroße und dem PTN-Level bestätigt werden.

Immunhistochemische Analyse der Tumorschnitte

Die Paraffin-fixierten Gewebeschnitte aus den U87MG-Tumoren wurden immunhistochemisch auf die Gewebe-Expression der Tumormarker für Proliferation (PCNA), Apoptose (POD) und Gefäßdichte (Von-Willebrand-Faktor) untersucht. Während die PCNA- und POD-Färbung keinen Unterschied zwischen den wt- und Rz-Tumoren aufwiesen (Daten nicht gezeigt), konnte bei der Von-Willebrand-Faktor-Färbung eine Differenz gezeigt werden. Die Schnitte der Rz261-Tumoren enthielten um 40% weniger Gefäße als die Kontrollschnitte aus wt-Tumoren. Die Abnahme der Gefäßdichte betraf bei den PTN-reduzierten Tumoren besonders die kleineren Gefäße, während die wenigen verbliebenen etwas größer zu sein schienen.

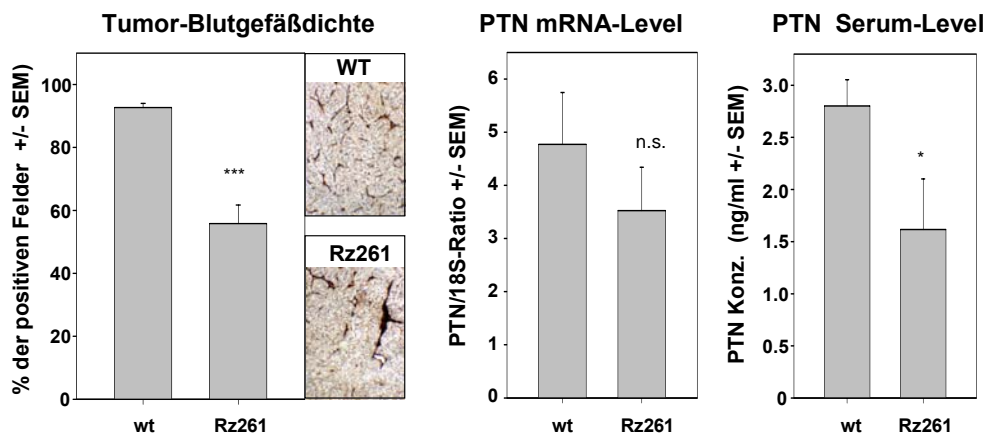


Abbildung 4.23 – Immunhistochemische Analyse der Tumorschnitte, Messung der PTN-Menge im Tumor und im Blut; * $P < 0,05$; ** $P < 0,1$; *** $P < 0,001$

Die *in vivo*-Studien mit U87MG-Zellen zeigten eine massive Beeinträchtigung des Tumorwachstums nach einer Rz-vermittelten PTN-Herunterregulierung und bekräftigten die *in vitro*-Daten. Neben der proliferationsstimulierenden Wirkung konnte mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse die angiogenetische Wirkung von PTN detektiert werden. Ferner ist es gelungen, eine Verminderung der PTN-Konzentration sowohl im Tumor wie auch im Blut nachzuweisen.

4.4 ALK-Einzeltargeting

4.4.1 Stabile Transfektion mit Ribozymen gegen ALK

Neben dem PTN-Einzeltargeting Studien wurden zwecks Untersuchung des dazugehörigen Rezeptors ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) Zelllinien mit konstitutiv verminderter ALK-Expression generiert. Dazu wurden wie im Falle der PTN-Einzeltargetings pRc/CMV-Vektor basierte Ribozym-Konstrukte benutzt, die eine Expression von Ribozymen gegen den ALK-Rezeptor vermitteln. Die drei ALK-Rz-Konstrukte mit den Bezeichnungen: ALK-Rz 1-3, ALK-Rz 3-2 und ALK-Rz 12-1 binden an verschiedenen Stellen auf der ALK-mRNA und eine führen zu ihrer Spaltung. Für die stabilen Transfektionen kamen ALK-positive Tumorzelllinien zum Einsatz (siehe 3.1.2), darunter die Glioblastom-Zelllinie U87MG, die Kolonkarzinomzelllinie Lovo und die Hodenkarzinomzelllinie NCCIT. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit G418 selektioniert und für weitere Studien verwendet.

4.4.2 Analytik des Expressionslevels

Quantitative PCR

Die ALK-Rz-transfizierten Zelllinien wurden initial auf die Rz-vermittelte ALK-Herunterregulierung untersucht. Aufgrund der sehr niedrigen Kopienzahl dieses Genprodukts in den Zellen war es nicht möglich, den ALK-Expressionslevel mit Hilfe des Northern oder Western Blots zu quantifizieren.

Erst durch den Einsatz der quantitativen RT-PCR gelang es die Verminderung der ALK-Expression eindeutig nachzuweisen. Die PCR-Reaktion erfolgte mit Hilfe von „Intron-Spanning“-Primern, die eine Vervielfältigung auf Basis von genomischer DNA verhindern. Neben spezifischen ALK-Primern wurden Actin-Primer für die Amplifizierung des gleichnamigen Referenzgens eingesetzt. Sämtliche Reaktionen wurden in mindestens dreifacher Ausführung pro cDNA durchgeführt. Die Crossing-Point-Daten der PCR-Produkte wurden anschließend mit der Delta-Delta CT-Methode ausgewertet und auf das Haushaltsgen normiert. Die folgenden Balkendiagramme zeigen die ALK/Actin-Ratio und der Leervektorwert dient als Kontrolle für die Herunterregulierung.

Die Quantifizierung offenbarte im Falle der Glioblastom-Zelllinie U87MG eine Herunterregulierung der ALK-Expression bei allen drei ALK-Rz-Konstrukten. Die mit Alk-Rz1-3 transfizierten U87MG-Zellen zeigten nur ca. 20% der ursprünglichen ALK-mRNA-Menge. Bei den Alk-Rz3-2- und Alk-Rz12-1-Linien betrug die ALK-Expression sogar unter 10% des Leervektorwerts.

Die ALK-Herunterregulierung konnte bei den Lovo-Zellen ebenfalls nachgewiesen werden. Die drei ALK-Konstrukte Rz1-3, Rz3-2 und Rz12-1 bewirken bei dieser Zelllinie eine Herunterregulierung auf entsprechend 10, 20 und 30% der Kontrollwertes der Leervektor-transfizierten Zellen. Wenn man die absoluten Werte der ALK/Actin-Ratio betrachtet, exprimieren die Lovo-Zellen wesentlich weniger Kopien des Alk-Rezeptors als die U87MG-Zellen, was die Unterschiede in den Rz-Effizienzen erklären könnte.

Die Hodenkarzinomzelllinie NCCIT wurde ebenfalls mittels der quantitativen PCR untersucht, die ALK-Herunterregulierung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die in späteren *in vitro*-Experimenten gezeigten antiproliferativen Effekte bei ALK-Rz-transfizierten NCCIT-Zellen deuten auf einen ALK-Knockdown hin, dieser konnte jedoch aufgrund des sehr niedrigen ALK-Expressionslevels nicht detektiert werden.

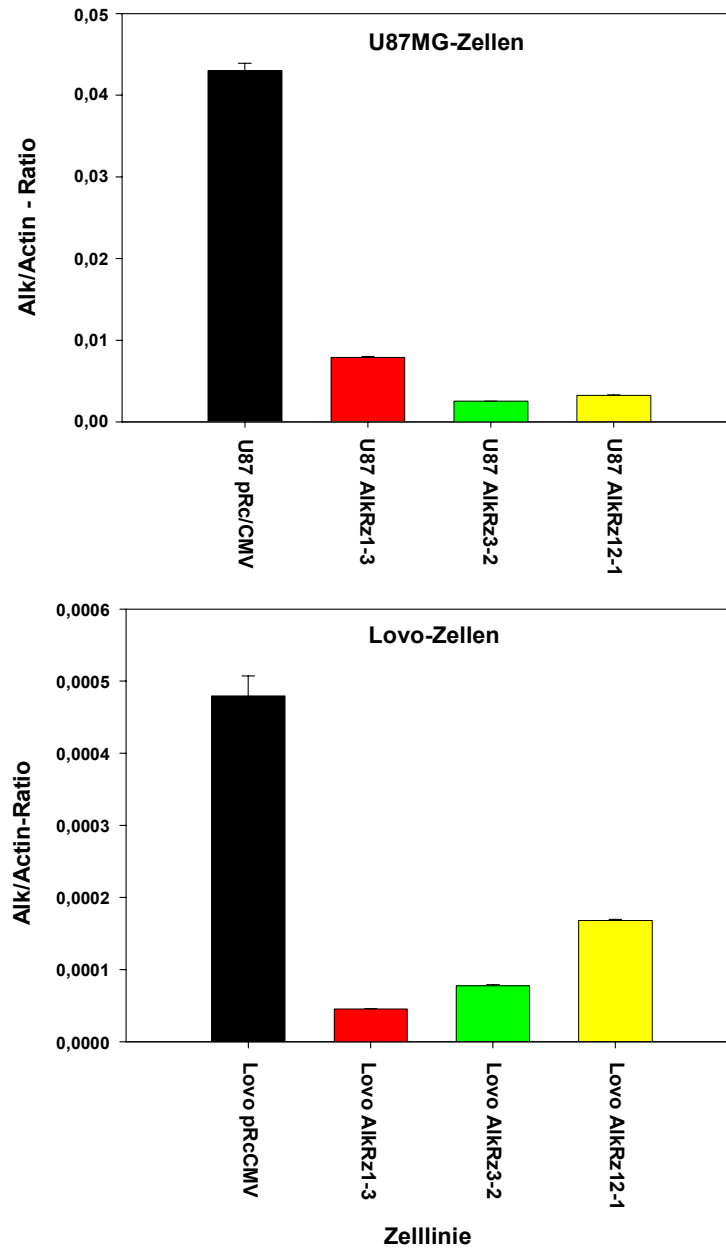


Abbildung 4.24 – ALK-Einzeltargeting - ALK-Quantifizierung in U87MG- und Lovo-Zellen mittels quantitativer RT-PCR

4.4.3 Einfluss der ALK-Expression auf die Zellproliferation *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch stabile Transfektion mit ALK-Konstrukten der ALK-Level in Tumorzelllinien dauerhaft vermindert werden kann, wurden *in vitro*- und *in vivo*-Assays durchgeführt, die eventuelle Auswirkungen auf das Tumorstadium verdeutlichen sollten.

Proliferationsassays

Das kontaktabhängige Wachstum der Tumorzellen nach Rz-vermittelter ALK-Herunterregulierung wurde zunächst an U87MG-Zellen untersucht. Für die Messungen wurden wt-, pRc/CMV-, ALK-Rz1-3- und ALK-Rz3-2-Zellen mindestens in Triplikaten in 96-Well-Platten eingesät und die Zellzahl zu mehreren Zeitpunkten mit dem WST-1-Reagenz vermessen. Der Kurvenverlauf zeigt schon bei frühen Messungen eine Verminderung der Proliferationsgeschwindigkeit bei ALK-Rz-transfizierten Zellen. Die ALK-Rz3-2 erreichten zum Ende des Versuchs nur ca. 60% der Zelldichte der pRc/CMV-Zellen und beim ALK-Rz1-3 war der Effekt mit unter 50% noch deutlicher.

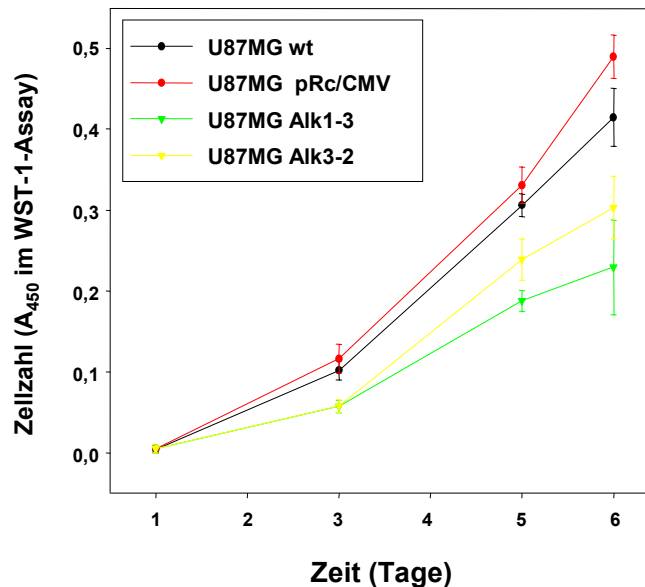


Abbildung 4.25 – ALK-Einzeltargeting – Proliferationsassay mit U87MG-Zellen

Der Einfluss der ALK-Herunterregulierung auf die Zellproliferation wurde ebenfalls in Lovo-Zellen untersucht. Gemessen wurde wieder die Zelldichte von zwei Kontrollzelllinien (wt und pRc/CMV) und zwei ALK-Rz-Zelllinien (1-3 und 3-2). Das Ergebnis dieses Experiments sah dem der U87MG-Zellen ähnlich. Die beiden ALK-reduzierten Zelllinien zeigten ebenfalls negative Proliferationseffekte und erreichten entsprechend nur unter 50% der Zelldichte der Leervektorzellen (Alk-Rz3-2) oder sogar unter 20% im Falle des Ribozyms ALK-Rz1-3. Die wt- und Leervektor-Zellen zeigten keine Differenzen im Wachstum, was einen unspezifischen Plasmid-Effekt ausschließen lässt.

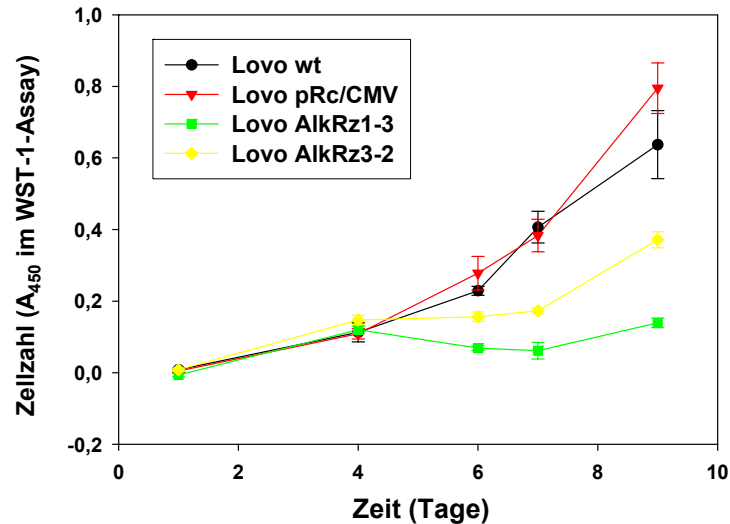


Abbildung 4.26 – ALK-Einzeltargeting – Proliferationsassay mit Lovo-Zellen

In Proliferationsassays mit den NCCIT-Zellen wurde zusätzlich noch ein drittes ALK-Ribozym eingesetzt (Rz12-1). Nach anfänglich geringen Proliferationsunterschieden im serumhaltigen Medium wurde die Serumkonzentration auf 2 % reduziert und dort konnte eine durch Rz-vermittelte ALK-Abnahme bedingte Wachstumsverschlechterung festgestellt werden. Die beiden Referenz-Zelllinien zeigten schon am Tag 5 des Versuchs eine höhere Zelldichte als die ALK-Rz-Zellen und dieser Effekt nahm bei den weiteren Messzeitpunkten noch zu. Alle drei Rz-transfizierten Zelllinien zeigten ohne den ALK-Rezeptor im serumarmen Medium eine sehr niedrige Proliferationsrate und erreichten am Ende des Experiments nur 10 bis 30% des wt- bzw. pRc/CMV-Proliferationsrate. Damit manifestierte sich beim Wachstum aller untersuchten Tumorarten eine Abhängigkeit von der ALK-Expression. Es traten zwar geringe Unterschiede zwischen den jeweiligen Rz-Konstrukten auf, die Tendenz zu einem proliferationshemmenden Effekt nach einer ALK-Herunterregulierung war jedoch bei allen Rz-Zelllinien eindeutig erkennbar.

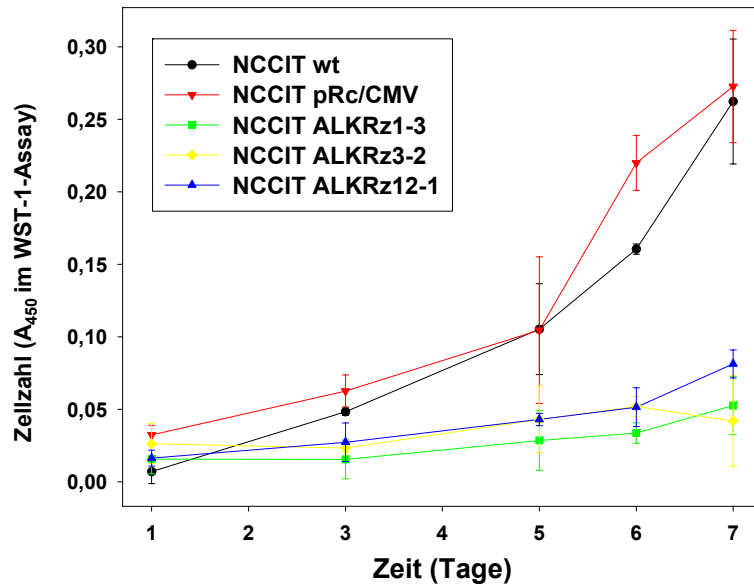


Abbildung 4.27 – ALK-Einzeltargeting – Proliferationsassay mit NCCIT-Zellen (2%FCS im Medium)

Weichagarassays

Ähnlich wie in PTN-Targeting-Studien wurden Weichagarassays zur Untersuchung des kontaktunabhängigen Wachstums der entsprechenden ALK-Rz-transfizierten Zelllinien durchgeführt. Bei den nachfolgenden Studien wurde die Fähigkeit der Kolonienbildung bei den wt, pRc/CMV und ALK-Rz-transfizierten Zellen (1-3, 3-2 und 12-1) untersucht. Bei den zuerst aufgeführten U87MG-Zellen war die Kolonienbildung nach der ALK-Herunterregulierung reduziert. Während die wt- und pRc/CMV-Zellen ungefähr 50 Kolonien pro Well mit einem Durchmesser von über 60µm bilden konnten, waren es bei den ALK-Rz-transfizierten Zellen nur entsprechend 10 bis 20 Kolonien, was eine Reduktion der Kolonienbildung um 60 bis 80% bedeutet.

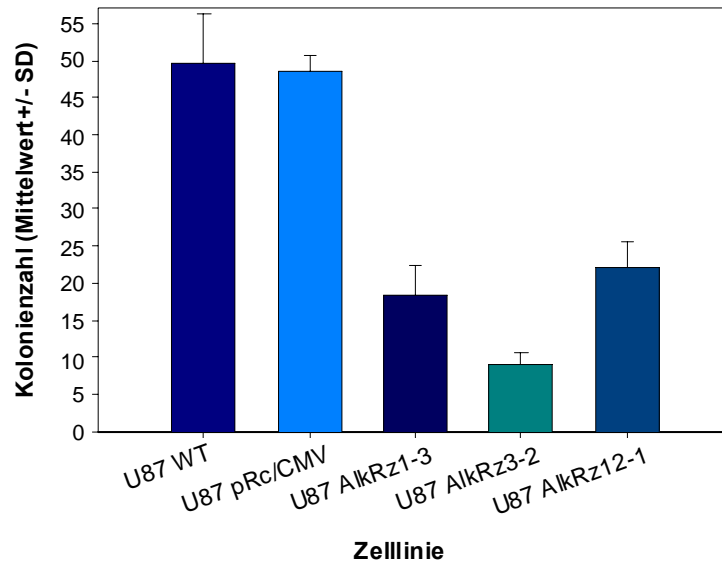


Abbildung 4.28 – ALK-Einzeltargeting – Weichagarassay mit U87MG-Zellen

Die Lovo-Zellen zeigten ebenfalls Unterschiede im kontaktunabhängigen Wachstum. Verglichen mit dem wt-Wert verursachte die Ribozym-vermittelte ALK-Herunterregulierung bei den Lovo-Zellen eine 50 bis 80% Verminderung der Kolonienbildung. Ähnlich wie bei den Studien zum kontaktabhängigen Wachstum gab es im Falle der mit dem Ribozym 1-3 transfizierten Zellen die stärksten Auswirkungen auf die Kolonienbildung.

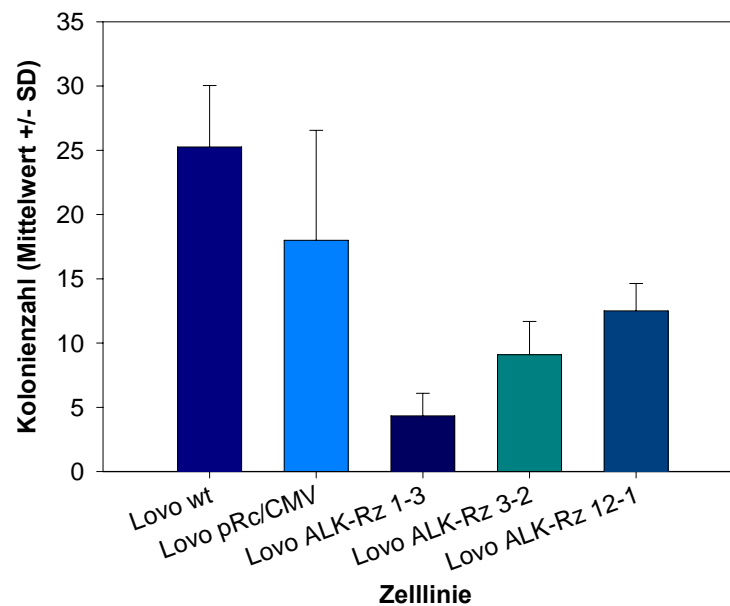


Abbildung 4.29 – ALK-Einzeltargeting – Weichagarassay mit Lovo-Zellen

Weichagar-Versuche mit NCCIT-Zellen ergaben im serumhaltigen Agar nur geringfügige Unterschiede in der Fähigkeit der Kolonienbildung. Wie im Falle der WST-Assays, konnte auch hier durch Verwendung des Serum-reduzierten Mediums der Rz-Effekt besser herausgearbeitet werden. Die anhand der gezählten Kolonien angefertigten Balkendiagramme zeigen eine Verminderung der Kolonienbildung im Weichagar. Wie bei den Lovo-Zellen stellte sich das ALK-Rz1-3 als das effektivste heraus und führte zu einer Reduktion der Kolonienbildung um 80%, verglichen mit dem wt- und pRc/CMV-Wert.

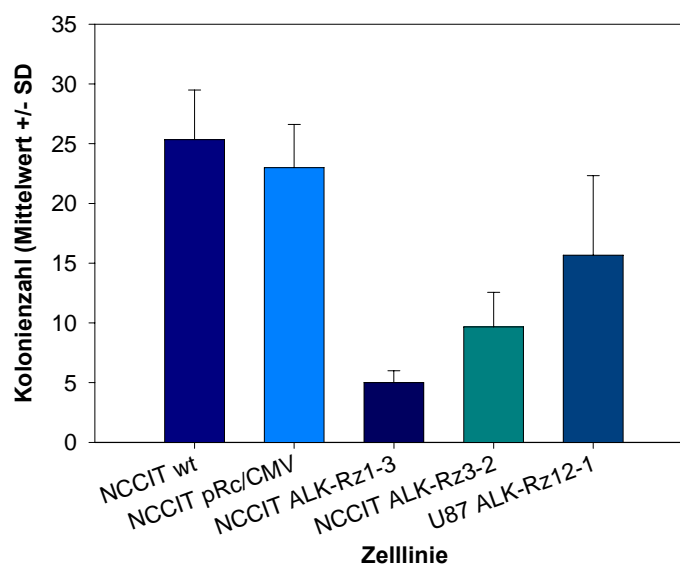


Abbildung 4.30 – ALK-Einzeltargeting – Weichagarassay mit NCCIT-Zellen

4.4.4 Einfluss der ALK-Expression auf die Zellproliferation *in vivo*

Der negative Einfluss der stabilen Verminderung des ALK-Levels auf die kontaktabhängige und kontaktunabhängige Proliferation der ALK-Rz-transfizierten Tumorzellen gab Anlass zur Untersuchung der Funktion von ALK im Tiermodell.

Mausexperimente

Zu diesem Zweck wurden aufgrund der Daten aus *in vitro*-Experimenten die Lovo-Zelllinien wt und Alk-Rz1-3 ausgesucht. Jeweils drei Millionen Zellen pro Injektion wurden subkutan in die Flanken von athymischen Nacktmäusen verwendet. Die Messung der Tumorgröße begann nach 5 Tagen, nachdem sichtbare Tumoren gebildet

wurden. Die Messungen erfolgten in zwei- bis dreitägigen Abständen und die Summen der Tumorflächen wurden anschließend als Wachstumskurven aufgetragen. Nach 10 Tagen wurden Unterschiede in den Tumorgrößen der beiden Versuchsgruppen sichtbar. Die wt-Tumoren wuchsen schneller als die ALK-Rz1-3-Tumoren und erreichten am Tag 25 eine kritische Größe, so dass der Versuch beendet werden musste. Die Tumorfläche der ALK-Rz-exprimierenden Tumoren betrug am Ende des Experiments nur ca. 30% der Fläche der wt-Tumoren. Ferner wiesen die Rz-Tumoren mehr nekrotische Bereiche auf (siehe Mausbild rechts unten).

Ähnlich wie im Falle der Rz-vermittelten PTN-Herunterregulierung bewirkte die stabile Verminderung der ALK-Expression eine Verschlechterung des Tumorwachstums *in vitro* und *in vivo*. Der PTN-Rezeptor scheint damit ebenfalls wie der dazugehörige Wachstumsfaktor PTN eine Schlüsselrolle beim Tumorwachstum zu spielen.

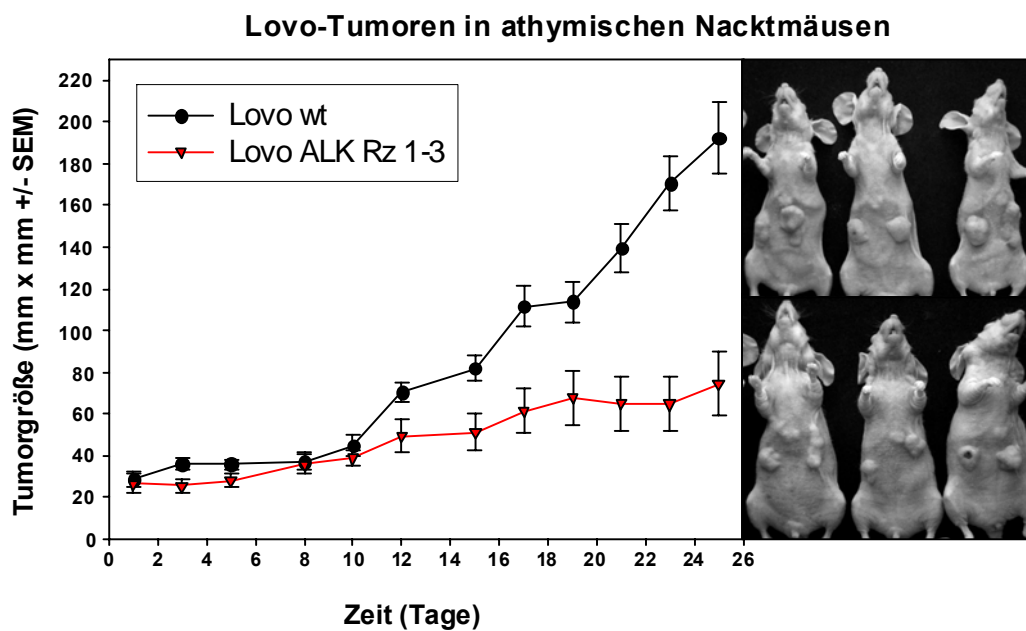


Abbildung 4.31 – ALK-Einzeltargeting – Mausexperiment mit Lovo-Tumoren

4.5 Auswirkung dominant-negativer Rezeptor-Mutanten auf das Tumorstadium

Neben der Untersuchung der Auswirkung der Rz-vermittelten ALK-Herunterregulierung auf Tumorzellen wurden inaktive ALK-Verkürzungsmutanten hergestellt und für stabile Transfektionen benutzt. Bei diesem Versuchsansatz sollte der Einfluss der Überexpression von Tyrosinkinase-defizienten, trunkeierten Rezeptormutanten auf das Proliferationsverhalten der Tumorzelllinien analysiert werden.

4.5.1 Herstellung der verkürzten Rezeptormutanten ALK-L und ALK-M

Basierend auf dem vollständigen ALK-Rezeptor wurden zwei verschiedene Verkürzungsmutanten kloniert. Bei der ALK-M Verkürzungsmutante wurde die gesamte intrazelluläre Domäne, die u.a. die Tyrosinkinase-Domäne enthält, entfernt. Bei der ALK-L-Mutante wurde zusätzlich noch die Transmembrandomäne deletiert um die Sezernierung des Proteins zu ermöglichen.

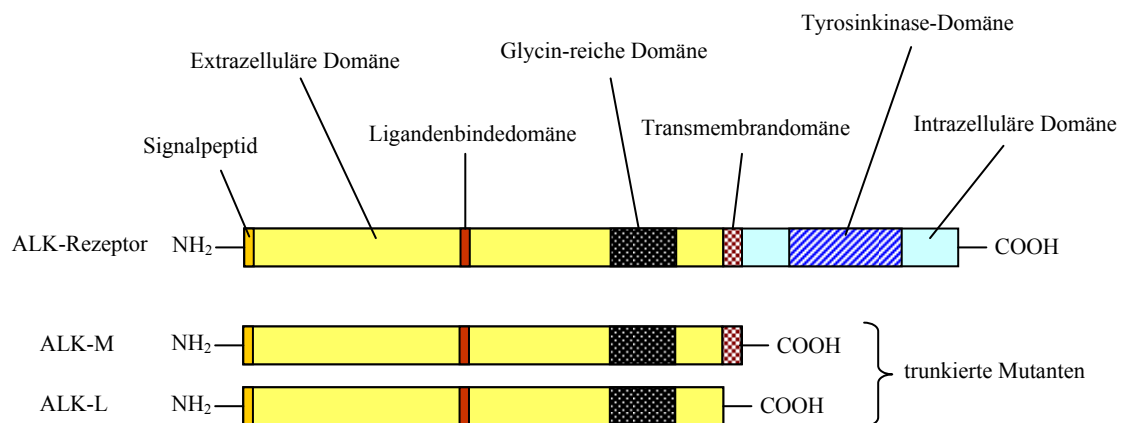


Abbildung 4.32 – „full length“-ALK und ALK-Verkürzungsmutanten

Stabile Transfektion verschiedener Tumorzelllinien

Die Verkürzungsmutanten ALK-L und ALK-M, jeweils im Expressionsvektor pRc/CMV wurden zur Transfektion folgender Tumorzelllinien verwendet: U87MG (Glioblastom), NCCIT (Hodenkarzinom) und Lovo (Kolonkarzinom). Die Transfektion erfolgte unter Benutzung des Transfektionsreagenz PEI und die Zellen wurden anschließend mit G418 selektioniert.

4.5.2 Proliferationsassays

Um die Auswirkung dominant-negativer Rezeptor-Mutanten auf das Tumorstadium zu untersuchen, wurden Proliferationsassays durchgeführt. Neben den Zelllinien, die mit ALK-Verkürzungsmutanten transfiziert wurden, kamen bei diesen Studien jeweils die wt und Leervektor-transfizierten (pRc/CMV) Zelllinien als Referenz hinzu.

Die Untersuchung der Verkürzungsmutanten in der Glioblastomzelllinie U87MG ergab keine Veränderung der Proliferationsgeschwindigkeit. Die wt, pRc/CMV und ALK-L-Kurven unterscheiden sich kaum in ihrem Verlauf. Lediglich die ALK-M-Kurve deutet bei den mittleren Messzeitpunkten auf eine etwas höhere Zelldichte hin.

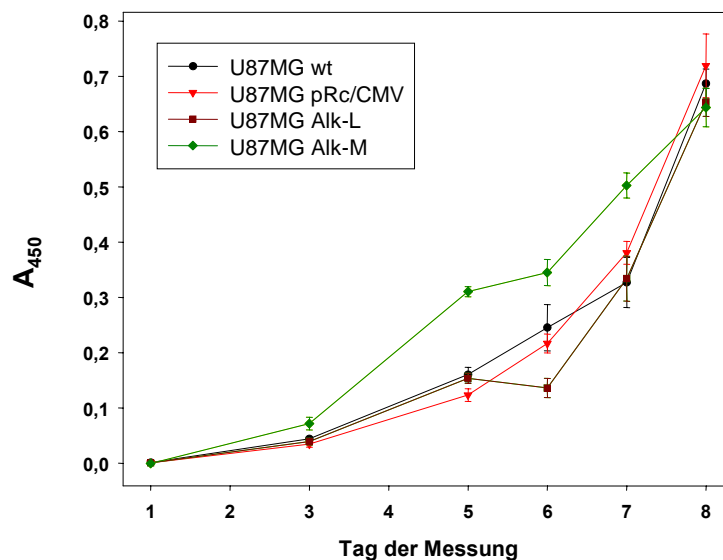


Abbildung 4.33 – Proliferationsassay mit U87MG-Zellen

Bei der Teratokarzinomzelllinie NCCIT gab es nur marginale Unterschiede im kontaktabhängigen Wachstum nach der Transfektion mit ALK-Verkürzungsmutanten. Die ALK-M-exprimierenden Zellen zeigten eine etwas langsamere Proliferation im Gegensatz zu den ALK-L-Zellen, die sogar zwischenzeitlich die Zelldichte des wt überstiegen.

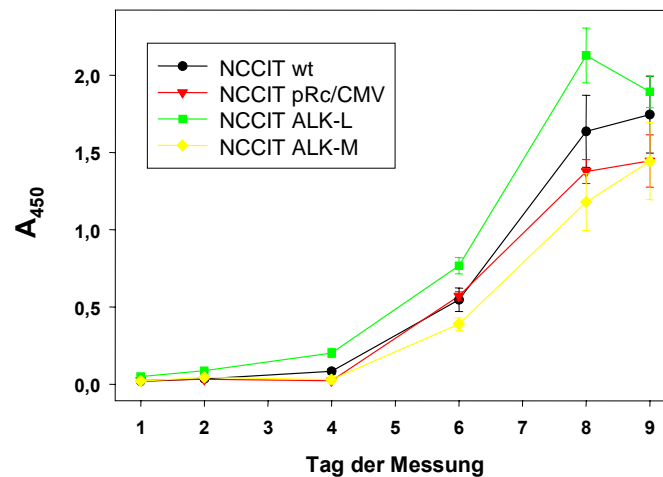


Abbildung 4.34 - Proliferationsassay mit NCCIT-Zellen

Die Lovo-Zellen zeigten hingegen eine Veränderung der Wachstumskinetik nach der Transfektion mit ALK-Verkürzungsmutanten. Sowohl ALK-L, wie auch ALK-M-Zellen wuchsen langsamer als die wt-Zellen und die Zelldichte glich sich erst am Ende des Experiments an.

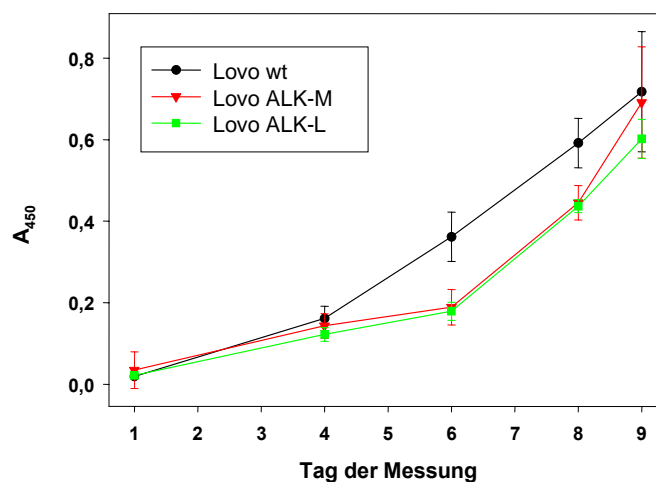


Abbildung 4.35 - Proliferationsassay mit Lovo-Zellen

4.5.3 Weichagarassays

Da die Ergebnisse der Proliferationsassays nur bei der Kolonkarzinomzelllinie Lovo einen negativen Einfluss auf das kontaktabhängige Wachstum der Zellen belegen konnten wurde die Auswirkung dominant-negativer Rezeptormutanten auf das kontaktunabhängige Wachstum der Tumorzelllinien U87MG- und NCCIT-Zellen untersucht.

Die U87MG-Zellen zeigten Unterschiede im kontaktunabhängigen Wachstum nach der Überexpression der löslichen Rezeptormutante von ALK. Während die Leervektor-transfizierten Zellen sowie die ALK-M transfizierten Zellen sehr gute Kolonienbildung aufwiesen, bildeten die ALK-L Zellen kaum große Kolonien im Weichagar. Diese über 90% entsprechende Herunterregulierung der Kolonienbildung wurde in mehreren unabhängigen Experimenten beobachtet und betraf lediglich die lösliche Rezeptormutante (ALK-L).

Dieses Phänomen wurde in den Weichagarassays mit NCCIT-Zellen bestätigt. Hier sieht man ebenfalls eine verminderte Fähigkeit der ALK-L überexprimierenden Zellen zur Kolonienbildung im Weichagar. Im Gegensatz zu den U87MG-Zellen wurde hier jedoch ebenfalls eine Abnahme der Kolonienzahl bei Zellen, die mit der membrangebundenen Rezeptormutante transfiziert wurden (ALK-M). Im Falle von ALK-L-Zellen zeigten die Experimente eine um ca. 80% reduzierte Kolonienbildung, gefolgt von den ALK-M-Zellen, die ungefähr 50% der Kolonienzahl von den Referenzlinien aufwiesen.

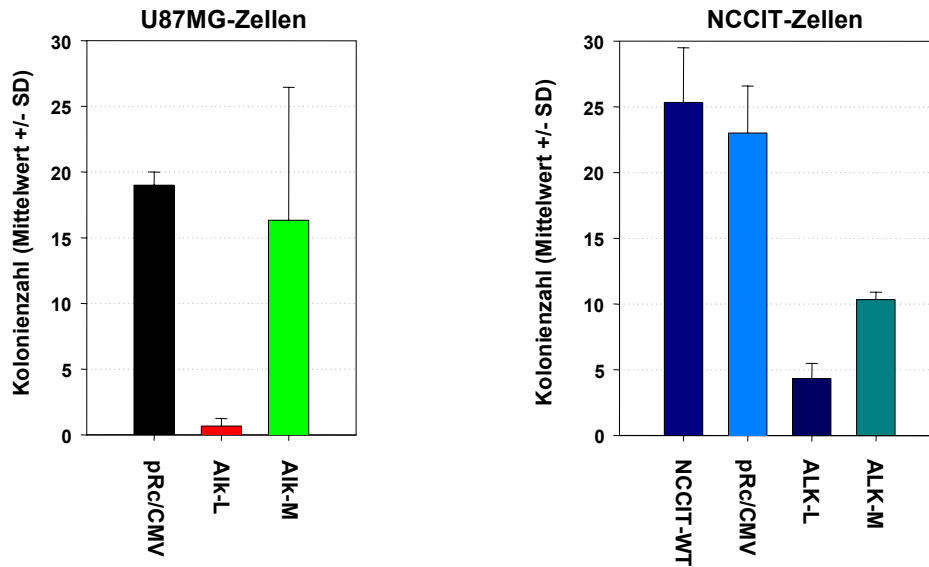


Abbildung 4.36 – Weichagarassay mit U87MG und NCCIT-Zellen

4.5.4 Proliferationsassay mit anti-PTN-Antikörpern

Neben den Studien mit ALK-Verkürzungsmutanten, wo in Weichagarversuchen der Einfluss inaktiver Rezeptormutanten auf das kontaktunabhängige Wachstum der Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, die PTN/ALK-Signaltransduktion durch anti-PTN-Antikörper zu unterbrechen. Diese Studie wurde mit NCCIT-Zellen durchgeführt und bezog sich nur auf das kontaktabhängige Wachstum. Die Zellen wurden initial in 96-Well-Platten kultiviert und nach der Anheftung erfolgte ein Mediumwechsel mit Antikörper-haltigem Medium. Danach wurde mit Hilfe des WST-1-Reagenz die Zelldichte an mehreren Zeitpunkten gemessen.

Die nach der graphischen Auswertung der jeweiligen Absorptionen erhaltenen Wachstumskurven zeigten keine Unterschiede in der Proliferationskinetik nach der Zugabe vom anti-PTN-Antikörper (anti-hPTN-Ab von R&D) ins Medium. Es wurden zwei relativ hohe Konzentrationen des Antikörpers verwendet, es konnte jedoch in keiner der Behandlungsgruppen ein Effekt gezeigt werden. Diese Versuche wurden ebenfalls für andere Zelllinien durchgeführt (U87MG, LOVO) und zeigten dort auch keinen inhibitorischen Effekt der anti-PTN-Antikörper.

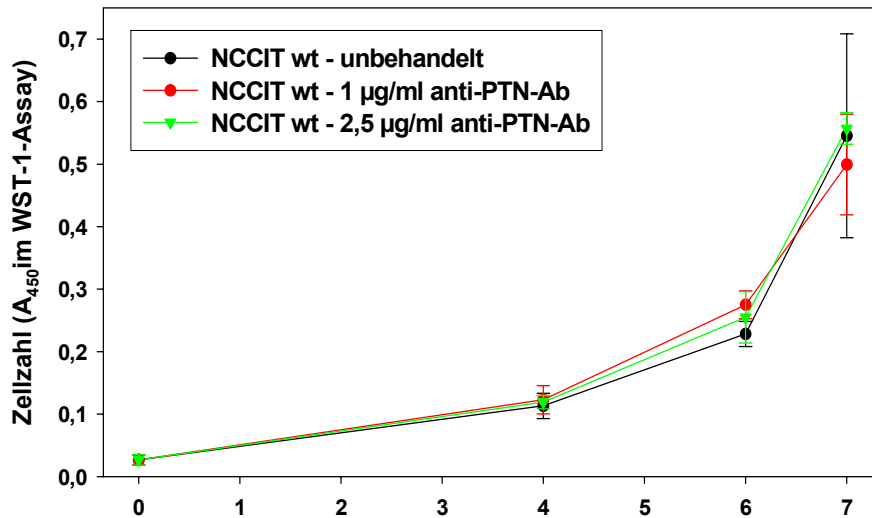


Abbildung 4.37 – Proliferationsassay mit NCCIT-Zellen (Behandlung mit einem anti-PTN-Antikörper)

4.6 PTN/ALK-Doppeltargeting

Die Einzeltargeting-Daten zeigten einen Einfluss der PTN- und ALK-Herunterregulierung auf das Wachstum von Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo*. Sowohl die Verminderung der Expression des Wachstumsfaktors PTN wie auch des dazugehörigen Rezeptors ALK führten einzeln zu antiproliferativen Effekten bei betroffenen Zellen. Die folgenden Studien sollten überprüfen, ob das stabile, gleichzeitige Ausschalten beider Genprodukte sich in Form von Synergismus oder Antagonismus auswirkt.

4.6.1 Konstitutive Verminderung der PTN- und Alk-Expression durch stabile Transfektion mit Ribozymen

Nachdem für die Einzeltargeting-Experimente stabil transfizierte Zelllinien mit jeweils einem Ribozym-Konstrukt hergestellt worden waren, wurden für die Doppeltargeting-Studien Zelllinien mit beiden Rz-Konstrukten generiert.

4.6.2 Analytik des Expressionslevels von PTN und ALK

Um sicherzustellen, dass die doppelt transfizierten Zellen über eine verminderte Expression beider Genprodukte verfügen, wurde der PTN- und ALK-Level der stabil transfizierten Zellen auf mRNA-Level analysiert. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Zellen gereinigt, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der quantitativen RT-PCR untersucht. Die wt- und pRc/CMV-cDNA wurde als Kontrolle für die Herunterregulierung bei einzel- und doppelt transfizierten Zellen benutzt.

Die PTN-Quantifizierung der Glioblastom-Zelllinie U87MG ergab eine Verminderung der PTN-Expression in Zellen, die mit dem PTN-Rz transfiziert wurden. Die PTN/Actin-Ratio, die den prozentualen Anteil der PTN-Expression an der Expression des Haushaltsgens β -Actin darstellt zeigt eine relative PTN-Herunterregulierung von über 90% verglichen mit den wt- und pRc/CMV-Balken. Die gegen PTN und ALK doppel-transfizierten Zellen exprimierten ähnlich wenig PTN wie ihre einzeln transfizierten Pendanten.

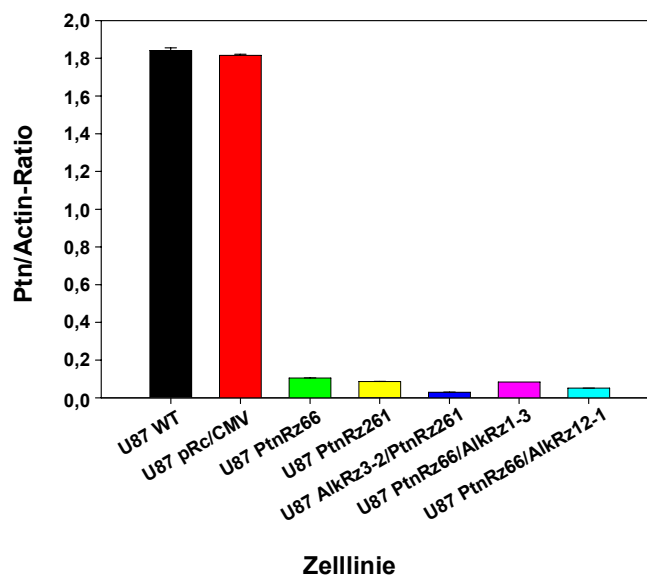


Abbildung 4.38 – PTN/ALK-Doppeltargeting - PTN-Quantifizierung in U87MG-Zellen mittels quantitativer RT-PCR

Die anschließende Untersuchung des ALK-Levels in U87MG-Zellen ergab ebenfalls eine starke Rz-vermittelte Herunterregulierung bei entsprechend transfizierten Zelllinien. Die relative Expressionsrate des Rezeptors war wesentlich niedriger als die des Wachstumsfaktors PTN und betrug bei den Kontrollzellen (wt und pRc/CMV) nur ca. 0,1% des Actin-Werts. Die ALK-Expression der Rz-transfizierten Zellen war reduziert auf unter 20% des Referenzwerts und im Falle der Rz-Kombination Alk-Rz3-2/PTN-Rz261 war sie sogar kaum messbar.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Rz-vermittelte PTN/ALK-Targeting zu einer Verminderung des mRNA-Levels beider Genprodukte führt. Die quantitativen RT-PCR-Reaktionen wurden ebenfalls für Kolon- und Hodenkarzinomlinien durchgeführt, ohne jedoch eindeutige Ergebnisse zu liefern.

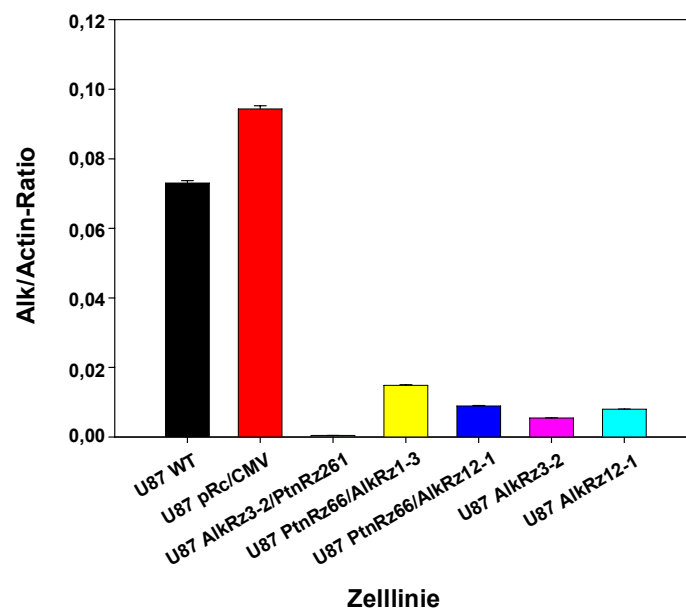


Abbildung 4.39 - PTN/ALK-Doppeltargeting - ALK-Quantifizierung in U87MG-Zellen mittels quantitativer RT-PCR

4.6.3 Einfluss der PTN- und ALK-Reduktion auf die Zellproliferation *in vitro*

Proliferationsassays

Der Einfluss des PTN/ALK-Doppeltargetings wurde zunächst im Hinblick auf das kontaktabhängige Proliferationsverhalten untersucht. Dazu wurden die U87MG-Zellen mit dem jeweiligen Rz-Konstrukt in 96-Well-Platten eingesät und mit Hilfe des WST-1 Reagenz vermessen. Die folgende Abbildung zeigt einen Unterschied in der Proliferationsgeschwindigkeit der Glioblastomzellen mit dem unveränderten PTN-Level (wt- und pRc/CMV-Kurven) und den doppelt transfizierten Zellen. Nach dem dritten Tag der Messung kamen die Kontrollzelllinien in eine exponentielle Wachstumsphase während die Rz-Zellen ihre Proliferation nur langsam fortsetzten. Man beachte, dass die Zelllinie ALK-Rz3-2/PTN-Rz261, die in der quantitativen RT-PCR die höchste Rz-vermittelte Herunterregulierung beider Genprodukte aufwies, auch das schlechteste Proliferationsverhalten zeigte, was eine direkte Korrelation belegt.

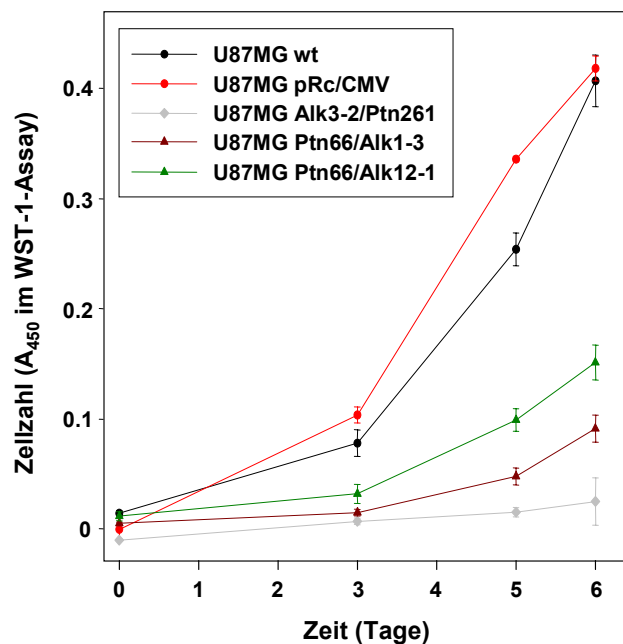


Abbildung 4.40 - PTN/ALK-Doppeltargeting – Proliferationsassay mit U87MG-Zellen

Die Proliferationsassays mit der Kolonkarzinom-Zelllinie Lovo ergaben eine Verlangsamung der kontaktabhängigen Proliferation nach dem PTN- und ALK-Doppeltargeting. Die Zelllinien mit den Ribozymkombinationen PTN-Rz66/ALK-Rz3-2 und PTN-Rz66/ALK-Rz12-1 wuchsen langsamer als die wt- und pRc/CMV-

transfizierten Zellen und erreichten am Ende der Messreihe nur ca. 50% der Zelldichte der Kontrollzellen.

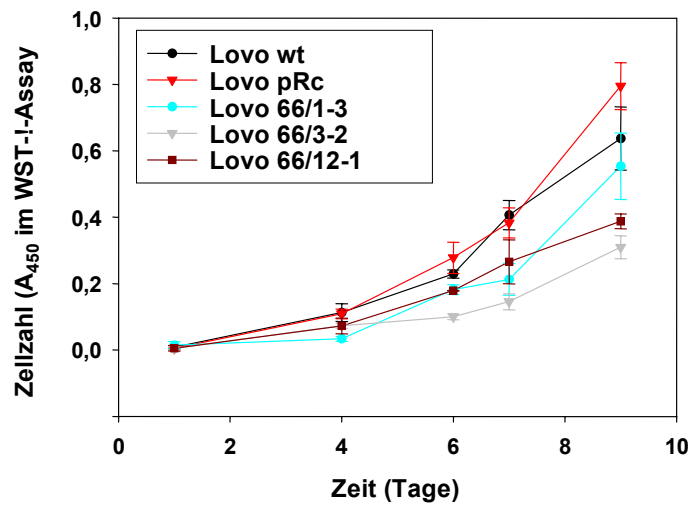


Abbildung 4.41 - PTN/ALK-Doppeltargeting – Proliferationsassay mit Lovo-Zellen

Weichagarassays

Bei den Weichagarversuchen wurden neben den Doppeltargeting-Zelllinien und den Kontroll-Zelllinien noch zwei Einzeltargeting-Zelllinien analysiert um potentielle additive Effekte zu untersuchen. Gewählt wurden die U87MG-Zelllinien ALK-Rz3-2 und PTN-Rz261 aufgrund des sehr starken Effekts dieser Kombination im Proliferationsassay. Die Auswertung des Weichagarassays ergab eine Verminderung der Kolonienbildung um über 40% bei den Einzeltargeting-Zellen, ca. 50% bei den Doppeltargeting-Linien PTN-Rz66/ALK-Rz1-3 und PTN-Rz66/ALK-Rz12-1 sowie eine fast komplette Wachstumshemmung bei der Kombination ALK-Rz3-2/PTN-Rz261. Beim Vergleich des ALK-Rz3-2/PTN-Rz261-Balkens mit den Balken der Einzeltargeting-Linien, die die Ribozyme einzeln exprimieren, wird ein additiver Effekt auf die Kolonienbildung sichtbar, der durch das gleichzeitige Ausschalten beider Genprodukte zustande kommt.

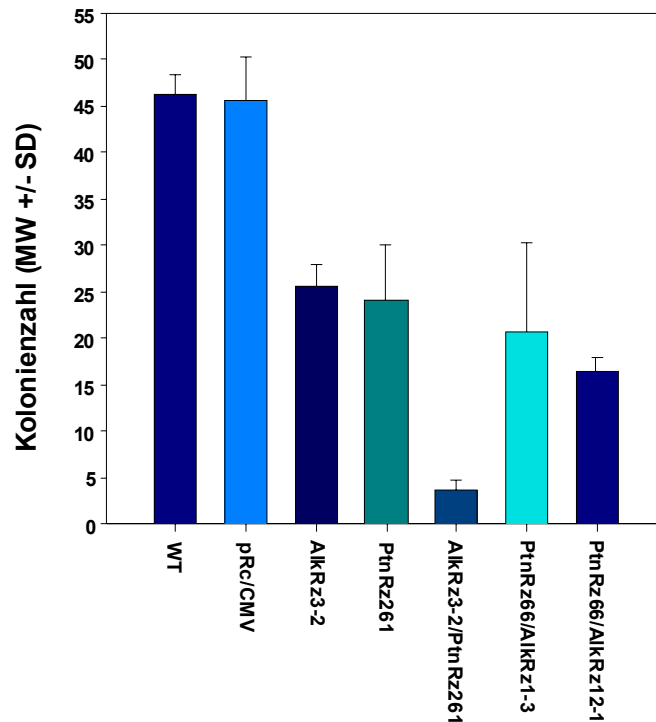


Abbildung 4.42 - PTN/ALK-Doppeltargeting – Weichagarassay mit U87MG-Zellen

Neben den U87MG-Zellen wurden ebenfalls die Lovo-Zellen im Hinblick auf die Doppeltargeting-vermittelte Änderung der Fähigkeit zur Kolonienbildung im Weichagar untersucht. Bei dieser Studie wurden die gleichen Konstrukte verwendet wie in den Proliferationsassays und man konnte ebenfalls wachstumshemmende Effekte bei doppelt transfizierten Zelllinien beobachten. Anders als beim kontaktabhängigen Wachstum ist der antiproliferative Effekt hier bei der Rz-Kombination PTN-Rz66/ALK-Rz3-2 etwas weniger ausgeprägt. Während die mit den Konstrukten PTN-Rz66/ALK-Rz1-3 und PTN-Rz66/ALK-Rz12-1 entsprechend ca. 80% und 90% weniger Kolonien aufweisen als die Kontroll-Zelllinien wt und pRc/CMV wirkte sich die dritte Rz-Kombination (66/3-2) mit ca. 25% weniger Kolonien weniger aus.

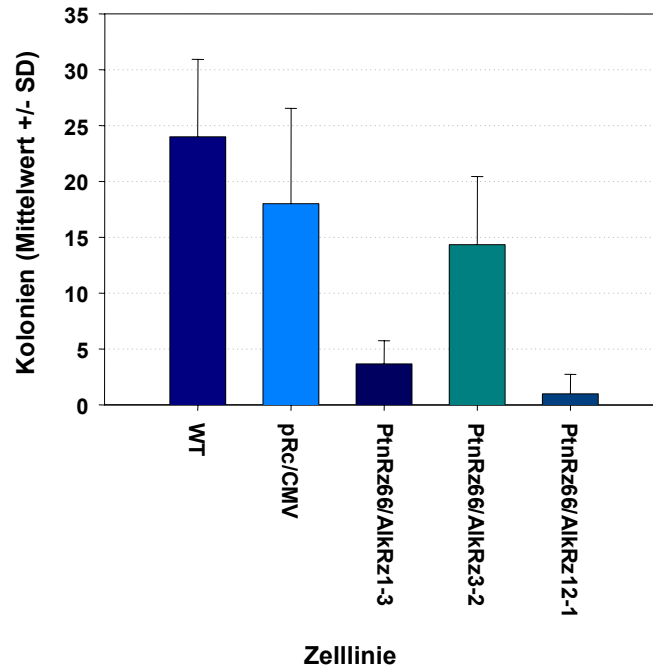


Abbildung 4.43 - PTN/ALK-Doppeltargeting – Weichagarassay mit Lovo-Zellen

Apoptose-Assays

Neben dem Cell Death Detection ELISA im Rahmen der PTN-Einzeltargeting-Studien wurde als weiteres Apoptose-Experiment der sogenannte Caspase-Assay durchgeführt. Hierbei wird indirekt über den Anstieg der Caspase-Aktivität die Intensität der Apoptose ermittelt. Dieses Experiment zeigte einen durch die Herunterregulierung von PTN bzw. ALK vermittelten Effekt auf die Apoptoserate von U87MG-Zellen. Bei den PTN-Rz-transfizierten Zellen (PTNRz66 und PTN-Rz261) wurde ein Anstieg der Caspase-Aktivität um ca. 50% verzeichnet, während bei Zellen, wo sowohl PTN wie auch der PTN-Rezeptor ALK herunterreguliert wurde (PTN-Rz66/ALK-Rz1-3), sogar eine Verdoppelung der Apoptoserate detektiert werden konnte. Lysate aus Zellen mit verminderter Expression von ALK manifestierten ebenfalls einen Anstieg der Caspase-Aktivität.

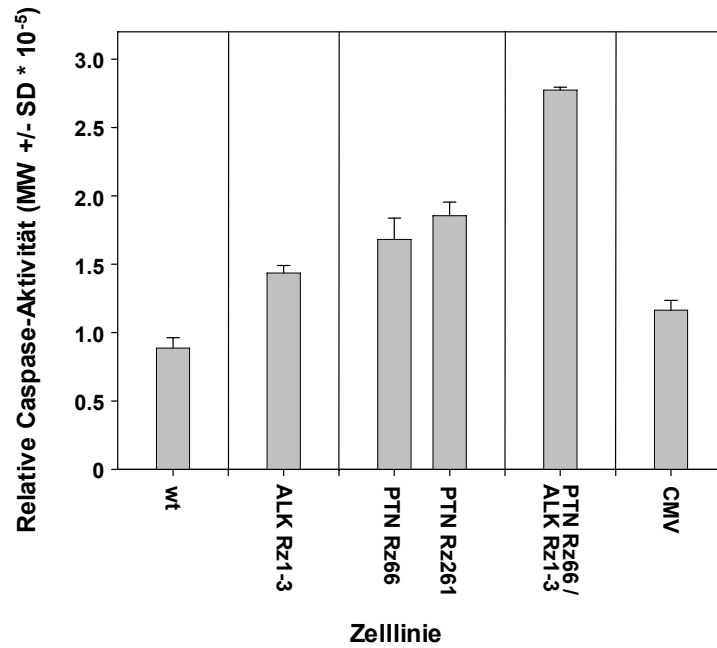


Abbildung 4.44 - Caspase-Assay mit U87MG-Lysaten

Wounding-Assays

Auch die bereits bei PTN-Einzeltargeting-Studien eingesetzte Methode des Wounding-Assays zeigte im Falle von PTN- und ALK-verminderten Zellen additive Effekte im Hinblick auf die Migrationsfähigkeit der Glioblastom-Zellen. Das Wiederverschließen der artifiziell eingefügten Schneise im Zellrasen erfolgt bei Doppeltargeting-Zellen langsamer als Referenzzellen. Während bei diesen bereits nach einigen Stunden eine Migration im Bereich der Schneise feststellbar war, konnte bei den PTN-Rz66/ALK-Rz1-3-Zellen noch kein Effekt detektiert werden.

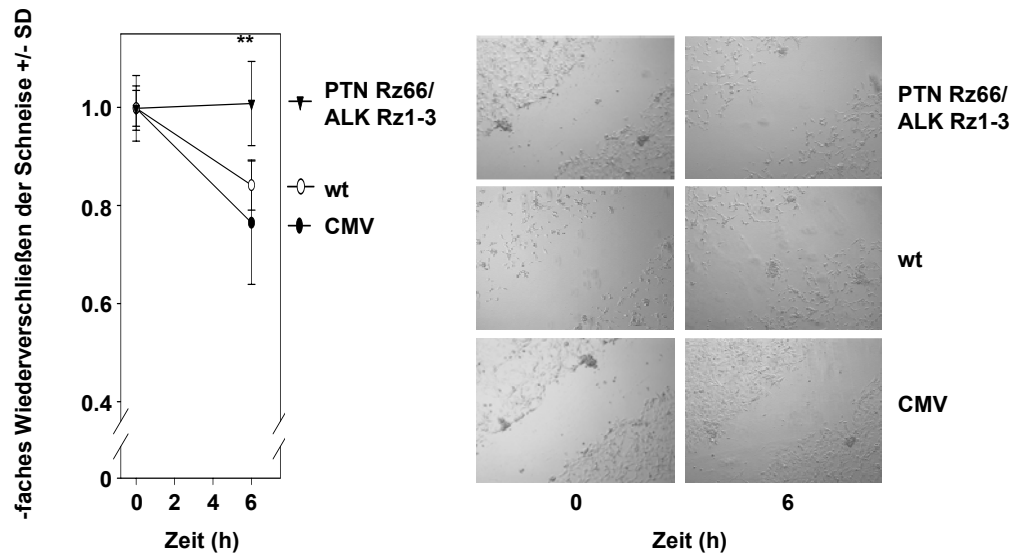


Abbildung 4.45 - Wounding-Assay mit U87MG-Zellen

4.6.4 Einfluss der PTN- und ALK-Reduktion auf die Zellproliferation *in vivo*

Mausexperimente

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das stabile, Rz-basierte Doppeltargeting von PTN und ALK in Glioblastom-Zellen zu einer zusätzlichen Verstärkung des wachstumshemmenden Effekts *in vitro* führt, wurden die entsprechend transfizierten U87MG-Zellen in Tierexperimenten untersucht. Zu diesem Zweck wurden je $2 \cdot 10^6$ Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert und s.c. in die Flanken athymischer Nacktmäuse injiziert. Die Mausgruppen bestanden aus vier Mäusen mit zwei Tumoren pro Maus. Nach sechs Tagen bildeten sich solide Tumoren aus, die ab diesem Zeitpunkt in zweitägigen Abständen vermessen wurden. Die folgende Abbildung stellt den Mittelwert der Tumorflächen der jeweiligen Zelllinie in Form von Wachstumskurven dar. Wie man aus dem Kurvenverlauf entnehmen kann, steigen die wt- und pRc/CMV-Kurven steiler an als die der Doppelknockdown-Zellen. Die durch die Injektion von Leervektor-Zellen entstandenen Tumoren erreichten bereits nach 18 Tagen eine für die Mäuse kritische Größe gefolgt von den wt-Tumoren am Tag 20, was zur Beendigung der jeweiligen Versuchsreihe führte. Die PTN-Rz66/ALK-Rz1-3-Tumoren blieben in den ersten drei Wochen des Experiments sehr klein und begannen erst mit großer Verzögerung zu wachsen. Die größte Rz-vermittelte Wachstumsverlangsamung zeigten die PTN-Rz66/ALK-Rz12-1-Zellen, die erst nach ca. 10 Wochen relativ kleine

Tumoren ausgebildet hatten. Die rechts eingefügten Bilder zeigen Tumoren zum Zeitpunkt des Abbruchs des Experiments bei der jeweiligen Gruppe und dienen nicht dem Größenvergleich. Die dritte Doppeltargeting-Zelllinie (ALK-Rz3-2/PTN-Rz261) erlaubte wegen der extrem schlechten Proliferation auf Plastik keine Gewinnung hinreichender Zellmengen für ein Mausexperiment (s. Kap. 3.6.3). Bei Studien mit kleineren n-Zahlen führte die Injektion dieser Zellen zum Teil nicht zur Ausbildung von subkutanen Tumoren in Nacktmäusen.

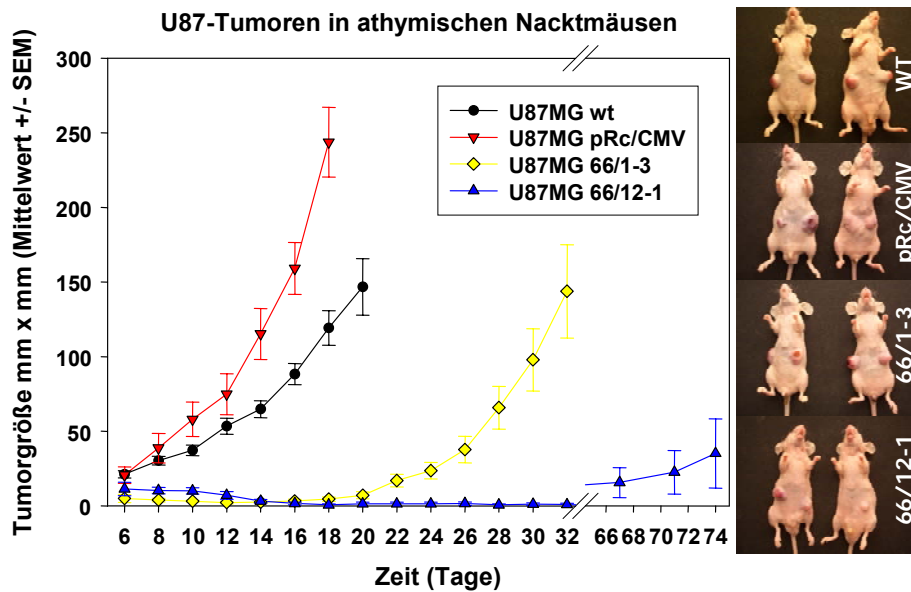


Abbildung 4.46 - PTN/ALK-Doppeltargeting – Mausexperiment mit U87MG-Tumoren

Zusammenfassend kann aufgrund der ermittelten Daten festgestellt werden, dass das stabile Rz-Doppeltargeting von PTN und ALK in Glioblastom-Zellen zu einer Verminderung der Proliferationsrate *in vitro* und einer Verlangsamung des Tumorwachstums *in vivo* führt. Die Bioeffekte des Doppeltargetings variierten gegenüber dem Einzeltargeting zwischen Addition und Synergismus und bestätigten die Signifikanz der herunterregulierten Genprodukte.

4.7 RNAi-basierter PTN-Knockdown

Die Studien mit stabil transfizierten Zelllinien, bei denen die PTN bzw. ALK-Expression durch Rz-Expressionsvektoren konstitutiv vermindert worden war, lieferten zahlreiche Ergebnisse über die Funktion dieses Wachstumsfaktor-Rezeptor-Paares und unterstrichen deren Signifikanz beim Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo*. Das stabile Rz-Targeting ermöglichte eine ausführliche Untersuchung des Einflusses der Herunterregulierung von bestimmten Genprodukten in Tumorzellen, bot jedoch nicht die Möglichkeit einer potentiellen Therapie. Da es weder möglich noch sinnvoll ist, im Körper ausgebildete Tumoren mit Ribozym-Vektoren gegen PTN oder ALK stabil zu transfizieren, wurde eine Targeting-Strategie angewandt, die eine transiente PTN-Herunterregulierung in Tumorzellen mit Hilfe von siRNA erlaubt. Die Benutzung der siRNA zum Gtargeting basiert auf dem Prinzip der RNA-Interferenz und bewirkt eine Degradation der mRNA des gewünschten Genprodukts. Bei den folgenden Experimenten wurde eine spezifische siRNA gegen PTN verwendet sowie eine Kontroll-siRNA, die gegen die Luciferase-mRNA gerichtet ist und in Tumorzellen keine mRNA-Degradation bewirkt.

4.7.1 Stabilisierung der siRNA mit PEI

Aufgrund der Instabilität von RNA, die durch das ubiquitäre Vorkommen von RNAsen bedingt ist, wurde zur Stabilisierung der eingesetzten siRNA das kationische Transfektionsreagenz Polyethylenimin benutzt. Das bereits bei den stabilen Transfektionen mit Ribozymen verwendete PEI (s. Kap. 3.3) bildet Komplexe mit der siRNA, schützt sie vor dem Verdau durch RNAsen und erlaubt einen effizienten Transfer in die Zelle, wo die siRNA ihre Wirkung entfaltet. Aus diesem Grunde erfolgten die folgenden transienten Transfektionen sowie die siRNA-Behandlung von Tumoren ausschließlich mit PEI-komplexierter siRNA.

4.7.2 PEI-vermittelte siRNA-Einschleusung *in vitro*

Für die *in vitro*-Experimente wurden die U87MG-Zellen transient mit siRNA gegen PTN bzw. gegen Luciferase (Kontroll-siRNA) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von JetPEI, zu Kontrollzwecken wurde jedoch auch unkomplexierte siRNA eingesetzt. Im Rahmen der Transfektion wurden je 100.000 Zellen/Well in eine 6-Well-Platte eingesät und mindestens 5 h mit siRNA/PEI-Komplexen inkubiert. Die siRNA-Menge betrug 30 bis 100 pmol pro Well und das N/P-Verhältnis lag bei 10 (Jet-PEI) bzw. 20 (F25-PEI). Die transfizierten Zellen wurden spätestens nach 24 h in neue Platten überführt und in WST-1-Assays oder Weichagarassays untersucht.

4.7.3 Nachweis des PTN-Knockdowns in siRNA behandelten Zellen

Die Effizienz der transienten Transfektion sowie die anschließende PTN-herunterregulierende Wirkung der PTN-siRNA wurde im Northern Blot und im ELISA untersucht. Im Falle des Northern Blots erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion die Zelllyse sowie eine anschließende RNA-Reinigung. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurden Hybridisierungen mit der PTN- und der 18S-Sonde durchgeführt und autoradiographisch ausgewertet. Die folgende Abbildung zeigt eine Abnahme der PTN-mRNA nach der Behandlung mit JetPEI-komplexierter siRNA gegen PTN. Die spezifische, aber unkomplexierte siRNA hingegen verursachte kein Effekt. Die gegen Luciferase gerichtete siRNA zeigte sowohl komplexiert wie auch unkomplexiert keine PTN-herunterregulierende Wirkung.

Zwecks proteinchemischer Quantifizierung des PTN-Levels wurde das konditionierte Medium (24 bis 72h nach der Transfektion) der siRNA-behandelten Zellen gesammelt und im ELISA vermessen. Mit Hilfe des rekombinanten PTN (rhPTN, siehe Materialteil) konnte die exakte PTN-Konzentration der Proben ermittelt werden. Während die PTN-Konzentration im Falle von Luciferase-siRNA behandelten Zellen ca. 21 ng/ml betrug bewirkte die spezifische PTN-siRNA Behandlung eine Reduktion des PTN-Levels um ca. 60% auf eine Restkonzentration von 9 ng/ml.

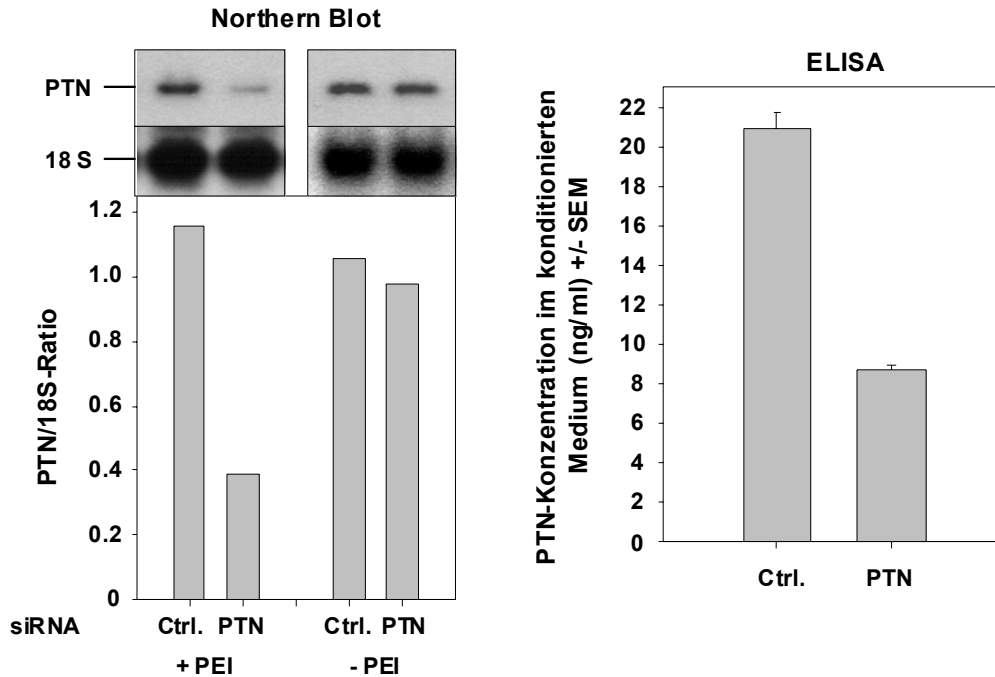


Abbildung 4.47 - Quantifizierung des PTN-Levels nach einmaliger siRNA -Behandlung mittels Northern Blots (RNA aus Zelllysaten) und ELISA (konditioniertes Medium)

4.7.4 Einfluss der PTN- und ALK-Reduktion auf die Zellproliferation *in vitro*

Proliferationsassays

Im Rahmen der Untersuchung des kontaktabhängigen Wachstumsverhaltens nach der Behandlung mit PEI-komplexierter PTN-siRNA wurden die U87MG-Glioblastomzellen nach der transienten Transfektion in 96-Well-Platten überführt und mittels des WST-Reagenz im Hinblick auf die Zellzahl vermessen. Wie man aus der unten aufgeführten Abbildung entnehmen kann, resultierte die siRNA-vermittelte PTN-Abnahme in einer massiven Proliferationsverlangsamung der spezifisch behandelten Zellen. Die mit Luc-siRNA behandelten Zellen erreichten am Tag 6 der Messung eine Konfluenz von fast 100% während PTN-siRNA behandelte Zellen langsamer wuchsen und eine Wachstumsverschlechterung von über 50% zeigten.

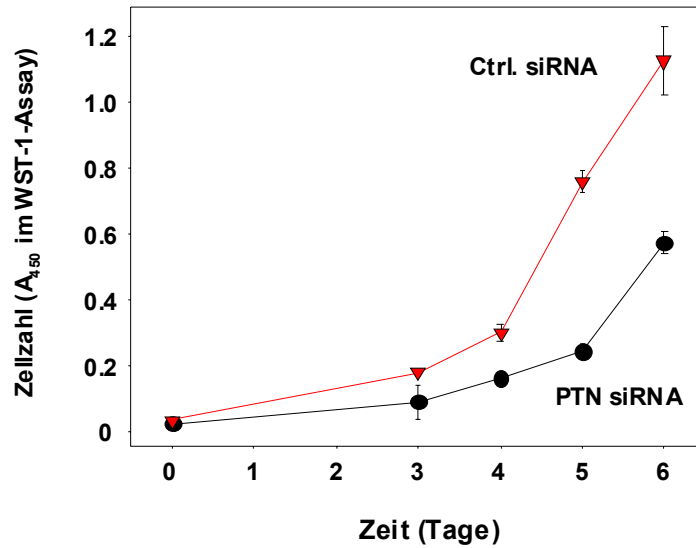


Abbildung 4.48 - kontaktabhängiges Wachstum von U87MG-Zellen nach siRNA-Behandlung im WST-1-Proliferationsassay

Weichagarassays

Die mit siRNA/PEI-Komplexen transfizierten U87MG-Zellen wurden für die Weichagarversuche trypsiniert und zusammen mit dem Agar in 6-Well-Platten gegossen. Nach der Inkubation im Brutschrank erfolgte die Kolonienzählung. Das Ergebnis dieser Experimente zeigte eine noch etwas stärkere Wirkung der siRNA-vermittelten PTN-Herunterregulierung auf die Proliferationsgeschwindigkeit der Glioblastomzellen. Die initial mit PTN-siRNA behandelten Zellen bildeten kleinere Kolonien im Weichagar, was nach der graphischen Auswertung der Kolonienzahl eine Reduktion des kontaktunabhängigen Wachstums von über 60% ergab. Damit konnte gezeigt werden, dass bereits eine einmalige Behandlung mit siRNAs gegen PTN einen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen ausübt.

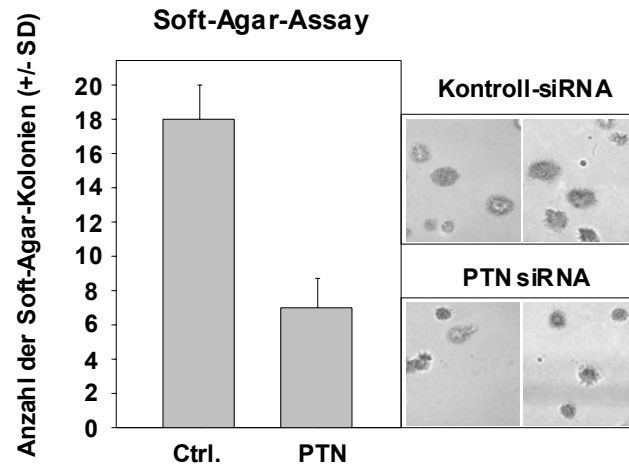


Abbildung 4.49 - Kontaktunabhängiges Wachstum von U87MG-Zellen nach siRNA-Behandlung im Weichagarassay

4.8 PEI/siRNA-basiertes PTN-Targeting im Mausmodell

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die PEI-vermittelte Einschleusung von siRNAs zu einer PTN-Herunterregulierung mit wachstumshemmenden Auswirkungen auf die Zellproliferation und Kolonienbildung *in vitro* führt, wurde die biologische Relevanz dieser Strategie im Mausmodell untersucht.

Die PEI-Komplexierung schützt die siRNA vor einer Degradation durch RNAsen und erlaubt einen Transport zu den Tumoren. In dieser Studie wurde aufgrund der Ergebnisse aus den Experimenten mit dem stabilen Rz-Targeting und dem siRNA-Targeting *in vitro* eine gegen Pleiotrophin gerichtete siRNA verwendet. Zu Kontrollzwecken erfolgte außerdem eine Behandlung mit siRNA gegen Luciferase, bzw. mit Hepes/NaCl. Als Modell für die wachstumshemmenden Effekte *in vivo* dienten Glioblastom-Xenotransplantate, die zuvor subkutan in die Flanken von athymischen Nacktmäusen injiziert wurden. Die hier benutzten U87MG-Glioblastomzellen erwiesen sich in Rz-Targeting Studien als sehr tumorigen. Für die Applikation der siRNA/PEI-Komplexe wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt, die subkutane, proxitumorale Injektion sowie die intraperitoneale Injektion.

4.8.1 Intraperitoneale Applikation von PEI/PTN-siRNA-Komplexen bei tumortragenden Nacktmäusen

Der erste Versuchsansatz beinhaltete die i.p. Applikation der PEI/siRNA-Komplexe. Zuvor wurden jeweils 2 Millionen U87MG-Zellen subkutan in die Flanken von athymischen Nacktmäusen injiziert (2 Tumoren/Maus) und bis zum Erscheinen von soliden Tumoren unbehandelt belassen. Danach erfolgte die siRNA-Behandlung, bei der die PEI/siRNA-Komplexe zwei bis drei Mal wöchentlich intraperitoneal in die Nähe der Tumoren injiziert wurden. Für eine Injektion wurden jeweils 8 µg siRNA verwendet, was ungefähr 0,64 nmol entspricht. In zwei- bis dreitägigen Abständen erfolgte die Vermessung der Tumorgröße (Länge x Breite in mm). Nach 15 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Tumoren entfernt. Die Hälfte der Tumormasse diente zur RNA-Gewinnung und die andere Hälfte wurde zur Anfertigung von paraffin-fixierten Gewebeschnitten verwendet. Wie die unten aufgeführte Abbildung zeigt, unterscheidet sich die Wachstumskinetik der mit PTN-siRNA behandelten Gruppe von der Kontrollgruppe, bei der nur Hepes/NaCl injiziert wurde. Bereits nach wenigen Tagen der Behandlung wurde ein wachstumshemmender Effekt der PTN-Herunterregulierung sichtbar und am Ende des Experiments betrug die Tumorgröße bei der PTN-siRNA behandelten Gruppe lediglich 60% des Werts der Kontrollgruppe.

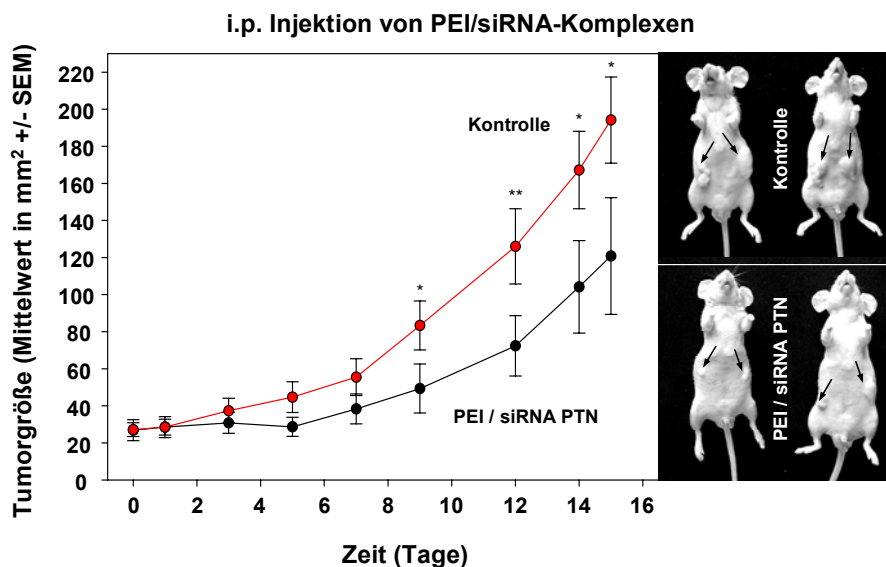


Abbildung 4.50 - Wachstum von U87MG-Glioblastom-Xenotransplantaten nach intraperitonealer Applikation von siRNA/PEI-Komplexen gegen PTN bei athymischen Nacktmäusen; * $P < 0,05$; ** $P < 0,1$

4.8.2 Subkutane Applikation von PEI/PTN-siRNA-Komplexen bei tumortragenden Nacktmäusen

Neben der intraperitonealen Applikationsform der PEI/siRNA-Komplexe erfolgte unter Benutzung der gleichen siRNA-Mengen eine subkutane Injektion in die Nähe der bereits etablierten Tumoren. Bei dieser Versuchsreihe diente allerdings eine Luc-siRNA als Kontrolle, um eventuelle unspezifische siRNA-Effekte auszuschließen. Die Injektionen sowie Vermessung der Tumoren verliefen wie bei der intraperitonealen Applikation und die Gruppen bestanden aus jeweils fünf Tieren. Nach der Beendigung des Versuchs wurden die Tumoren ebenfalls entfernt und anteilig zur RNA-Gewinnung sowie Anfertigung von Tumorschnitten verwendet. Die subkutane, proxitumorale Verabreichung der siRNA-Komplexe erwies sich in diesem Tierexperiment als noch effizienter in der Wachstumshemmung der behandelten Tumoren. Die PTN-siRNA-Gruppe zeigt ein sehr langsames Wachstum und kommt bis zum Ende des Versuchs nicht in eine logarithmische Wachstumsphase im Gegensatz zu den Luc-siRNA behandelten Tumoren, die bereits am 5. Tag der Behandlung größer waren und am Tag 21 wegen ihrer Größe zur Beendigung des Experiments führten (siehe Abb. 4.51). Zu diesem Zeitpunkt betrug die Tumorgöße der PTN-siRNA behandelten Versuchsgruppe im Schnitt lediglich ca. 60mm^2 während die Kontrollgruppe eine mittlere Tumorgöße von ca. 180mm^2 aufwies. Dieses Ergebnis belegt eindeutig die Möglichkeit einer subkutanen Applikation der PEI/siRNA-Komplexe und bekräftigt zuvor erhaltene Daten zum PTN-Targeting.

4.8.3 Immunhistochemische Analyse der Tumorschnitte

Zwecks immunhistochemischer Untersuchung der mit siRNA/PEI-Komplexen behandelten U87MG-Tumoren wurden aus einem Teil der Tumormasse Paraffinschnitte angefertigt. Mit Hilfe von spezifischen anti-PTN-Antikörpern (R&D und Santa Cruz) wurde eine PTN-Färbung durchgeführt und auf Basis der Färbeintensität elektronisch ausgewertet. Die so erhaltene relative PTN-Konzentration wurde in Form von Balkendiagrammen aufgetragen (siehe Abb. 4.52).

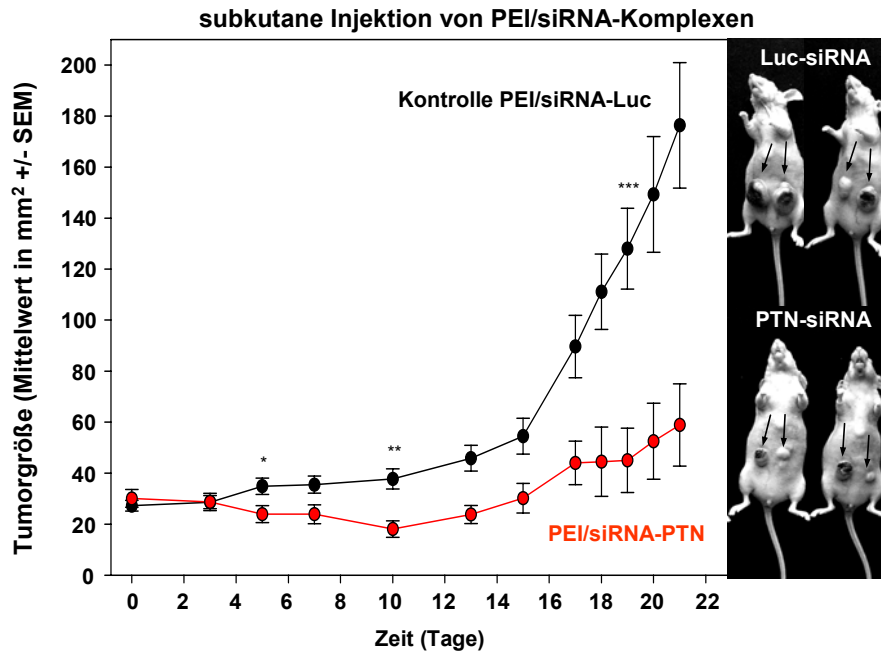


Abbildung 4.51 - Subkutane, proxitumorale Applikation von siRNA/PEI-Komplexen gegen PTN bei tumortragenden Nacktmäusen; * $P < 0,05$; ** $P < 0,1$; *** $P < 0,001$

Sowohl anhand der optischen Beurteilung der Färbintensität der Gewebeschnitte, wie auch nach der computergestützten Auswertung erkennt man eine Reduktion der PTN-Konzentration auf Proteinebene in PTN-siRNA behandelten U87MG-Tumoren (siehe Abb. 4.52).

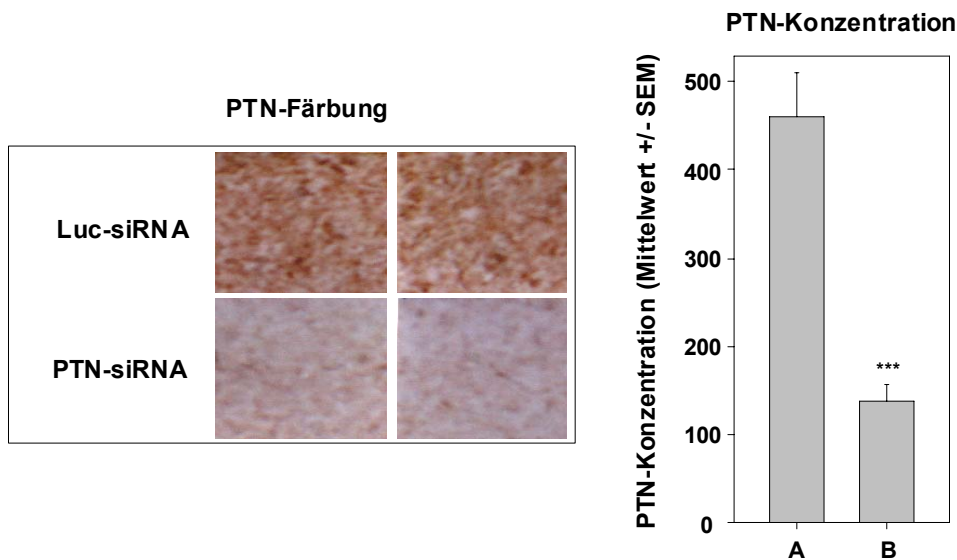


Abbildung 4.52 - PTN-Färbung der Tumor-Gewebeschnitte nach abgeschlossener siRNA-Behandlung; links: PTN-Färbintensität nach der Behandlung mit PTN und Luc-siRNA, rechts: relative PTN-Konzentration im Tumorgewebe; *** $P < 0,001$

5 Diskussion

Vorstudien zur Relevanz von PTN und ALK

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die funktionelle Relevanz des Heparin-bindenden Wachstumsfaktors Pleiotrophin und seines Bindungspartners, der Rezeptor-Tyrosinkinase ALK, auf das Wachstum verschiedener Tumortypen untersucht. PTN wurde ursprünglich, neben seiner physiologischen Rolle als ontogenetisch relevantes Zytokin mit begrenztem Vorkommen bei adulten Individuen, mit der Induktion der Neuritenausprossung in diversen Zelllinien (Rauvala 1989; Hampton, Marshak et al. 1992; Kuo, Huang et al. 1992) sowie mit mitogenen Eigenschaften auf Epithel- und Endothelzellen (Milner, Li et al. 1989) in Verbindung gebracht. Zusammen mit Midkine bildet PTN die Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren, die für mitogene, transformierende, chemo- und haptotaktische sowie angiogene Effekte auf Zellen bekannt ist. Parallel zu den protoonkogenen Eigenschaften wurde die erhöhte Expression in diversen Tumortypen beobachtet, was auf eine Schlüsselfunktion beim Tumorwachstum hindeutet.

Die Wechselwirkung von PTN mit dem zunächst als konstitutiv aktivierte Fusionsmutante einer Tyrosinkinase im anaplastischen T-Zell Lymphom entdeckten und als „Orphan Receptor“ betrachteten ALK wurde erst vor einigen Jahren beschrieben (Stoica, Kuo et al. 2001). Der ALK-Rezeptor ist, wie im einleitenden Teil dieser Arbeit erläutert, ein PTN-bindendes Molekül (Stoica, Kuo et al. 2001; Stoica, Kuo et al. 2002) und ist außerdem beim alternativen PTN/ PTPR β / ζ -Signalweg indirekt beteiligt (Maeda, Nishiwaki et al. 1996; Meng, Rodriguez-Pena et al. 2000; Perez-Pinera, Zhang et al. 2007). Ähnlich wie sein Bindungspartner PTN ist ALK vor allem während der Ontogenese im Zentralnervensystem exprimiert und scheint ebenfalls bei aggressiven Tumoren im undifferenzierten Stadium eine große Rolle zu spielen.

Die bisher bei PTN beobachteten proliferationsstimulierenden Effekte ergaben an dieser Stelle gemeinsam mit der von ALK aktivierten MAP-Kinase-Kaskade (Bowden, Stoica et al. 2002) sowie RAS/ERK, JAK/STAT3 und PI3K ein zusammenhängendes Bild und erklärten die tumorigenen Auswirkungen der PTN-Überexpression in zahlreichen

Tumoren. Obwohl relativ viele Publikationen das Vorkommen des Rezeptors ALK sowie seines Bindungspartners erwähnen, gab es bisher nur wenige Studien, die die funktionelle Relevanz beider Proteine zusammenhängend erklären.

Eigene Daten zur Funktion von PTN und ALK beim Tumorwachstum

Die für die Untersuchung der Funktion von PTN und ALK eingesetzten humanen Tumorzelllinien U87, LOVO und NCCIT vertreten drei verschiedene Tumortypen (Glioblastom, Kolonkarzinom und Hodenkarzinom) und wurden primär aufgrund des Vorliegens beider Proteine ausgesucht, was in immunochemischen und PCR-Experimenten belegt wurde. Diese Daten stehen im Einklang mit der bisherigen Literatur (Mentlein and Held-Feindt 2002; Lu, Jong et al. 2005). Im Gegensatz zu den Glioblastomzelllinien und Hoden-CA-Zelllinien, wo PTN größtenteils nachgewiesen werden konnte, war Lovo die einzige PTN-positive Kolon-CA-Zelllinie. Den ALK-Rezeptor exprimierten die meisten hier untersuchten Zellen bis auf die Glioblastomlinie GH.

In den Zelllinien U87, LOVO und NCCIT wurde anschließend die Expression eines oder beider Faktoren mittels Ribozymen vermindert. Im Anschluss wurden die Auswirkungen auf das Wachstum der betroffenen Zelllinien untersucht.

Neben der Verminderung der PTN- bzw. ALK-Expression wurden Zelllinien generiert, die rekombinantes, humanes PTN exprimieren und über affinitätschromatographische Aufreinigungsverfahren die Gewinnung dieses Wachstumsfaktors in einer bioaktiven Form ermöglichen. Ferner wurde Pleiotrophin auch aus U87MG-Zellen gewonnen, die es endogen exprimieren. Stimulationsversuche mit rekombinantem PTN bestätigten seine Rolle beim Tumorwachstum und zeigten, dass die Signalweiterleitung vom Vorliegen des ALK-Rezeptors abhängig ist.

PTN

Wie zahlreiche Publikationen belegen, korreliert das Auftreten solider Tumoren oft mit signifikanten PTN-Serumspiegelerhöhungen (Czubayko and Wellstein 1994; Schulte, Lai et al. 1996; Nakanishi, Kadomatsu et al. 1997; Relf, LeJeune et al. 1997; Chopra, Dinh et al. 1998; Souttou, Juhl et al. 1998; Vacherot, Caruelle et al. 1999; Weber, Klomp et al. 2000; Jager, List et al. 2002; Klomp, Zernial et al. 2002; Aigner, Brachmann et al. 2003; Moon, Park et al. 2003; Hatziapostolou, Delbe et al. 2005; Wu, Barusevicius et al. 2005). Die erhöhten PTN-Spiegel gelten als negativer prognostischer Faktor beim Pankreaskarzinom und können potentiell als postoperativer Verlaufsmarker eingesetzt werden. In Studien an Myelomzellen konnte sogar durch den Einsatz von anti-PTN-Antikörpern eine Wachstumsinhibition erzielt werden (Chen, Gordon et al. 2007). Viele klinische Studien zeigen eine Pleiotrophin-vermittelte Tumorprogression und identifizieren PTN als ein interessantes Target.

Frühere Publikationen zeigten, dass Glioblastome, die zu den aggressivsten Tumoren gehören, sowohl PTN und Midkine, wie auch beide PTN-Rezeptoren (ALK und PTPR β/ζ) exprimieren. Die funktionelle Relevanz beider Rezeptoren und Midkine in Glioblastomen konnte zwar nachgewiesen werden (Mishima, Asai et al. 1997; Stoica, Kuo et al. 2002), für PTN lagen jedoch bisher keine Daten vor. Was weitere hier untersuchten Tumortypen betrifft, waren die Erkenntnisse über die Rolle des ALK-Rezeptors ebenfalls sehr lückenhaft oder fehlten gänzlich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die funktionelle Relevanz von PTN in Glioblastomen, Kolon-, und Hoden-Karzinomen beim Tumorwachstum gezeigt werden. In den zu diesem Zweck ausgewählten, PTN-positiven Zelllinien wurde mittels Ribozym-Targetings die PTN-Expressionsrate stabil verringert. Die Verwendung der zuvor erprobten Transfektionsmethoden und Ribozym-Konstrukte, deren Funktionsfähigkeit in früheren Studien gezeigt wurde (Czubayko, Riegel et al. 1994), führte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls zur erfolgreichen PTN-Herunterregulierung. Die robuste Verminderung der zellulären PTN-Expression wurde auf mRNA- und Proteinebene gezeigt und ermöglichte die eingehende Untersuchung in Zellkultur- und *in vivo*-

Studien. In den Zelllinien U87MG, Lovo und NCCIT resultierte dies in der Hemmung der kontaktabhängigen Zellproliferation und konnte im Rahmen der nachträglichen Wiederherstellung des Ausgangszustands durch externe PTN-Zugabe revertiert werden, was die Schlüsselrolle von PTN beim Tumorwachstum belegt. Wie die Wounding-Assays mit U87MG-Zellen zeigen, konnte durch die Ribozym-vermittelte PTN-Herunterregulierung ebenfalls die Fähigkeit der Zellen zur Migration vermindert werden.

Da das kontaktabhängige Wachstum die *in vivo*-Situation jedoch nicht ideal widerspiegelt wurden ebenfalls Weichagarassays durchgeführt. Die Ergebnisse solcher Studien müssen nicht zwangsläufig die Befunde aus Experimenten mit kontaktabhängigem Wachstum der Zellen wiedergeben und liefern deshalb aufschlussreiche Daten, die bei der Planung von weiterführenden und kostenintensiven *in vivo*-Experimenten hilfreich sind. Im Falle der untersuchten Zelllinien konnte eine starke, PTN-abhängige Wachstumsinhibition festgestellt werden. Durch den Einsatz verschiedener PTN-Ribozym-Zelllinien mit unterschiedlichen PTN-Restkonzentrationen konnte ebenfalls ein Gen-Dosis-Effekt beobachtet werden.

Das PTN-abhängige Tumorwachstum wurde mit Hilfe von subkutanen Xenotransplantaten in athymischen Nacktmäusen untersucht und bestätigte die *in vitro*-Daten. Zur Tierersparnis wurden zu diesem Zweck lediglich 2 Zelllinien (U87MG und Lovo) mit jeweils effektivsten Ribozym-Konstrukten, sowie entsprechenden Kontrollen, ausgewählt. Die PTN-herunterregulierten Tumorzellen bildeten innerhalb des Untersuchungszeitraums kleinere Tumorknoten als die Zellen der Kontrollgruppe und die anschließende Analyse der Tumor-Gewebeschnitte belegte die Übereinstimmung mit reduzierten PTN-Konzentrationen im Tumor.

Im Falle der Glioblastomzellen wurden bereits in früheren Publikationen erhöhte PTN-Level im Patientenserum gezeigt (Souttou, Juhl et al. 1998; Jager, List et al. 2002; Aigner, Brachmann et al. 2003) und das Vorkommen dieses Wachstumsfaktors neben der Korrelation mit dem Auftreten PTN-positiver Tumoren inklusive der Proliferations-stimulierenden Rolle als prognostischen Marker postuliert. Neben der deutlich verminderten PTN-Menge in den untersuchten Xenotransplantaten konnte eine PTN-

Targeting-abhängige Abnahme der Gefäßdichte festgestellt werden. Diese Beobachtung bestätigt die bereits zuvor beschriebene Funktion von PTN als Angiogenesefaktor (Laaroubi, Delbe et al. 1994; Choudhuri, Zhang et al. 1997). Trotz anderer Erwartung konnte aufgrund der Heterogenität der Gewebeschnitte mit dem eingesetzten PCNA-Antikörper kein Unterschied in der Proliferationsintensität detektiert werden. Ähnliches trifft für die Apoptoserate zu, wobei an dieser Stelle die *in vitro*- und *in vivo*-Daten übereinstimmen.

ALK

Das geringe Expressionsniveau des ALK-Rezeptors macht ihn zu einem sehr anspruchsvollen Target. Die initial schon geringen Mengen dieses Genprodukts in den Zellen erschwerten die Detektion und die anschließende Analytik. Das stabile, Ribozym-basierte Targeting erlaubte es jedoch die ALK-Expression zuverlässig herunterzuregulieren, was die anschließende Analyse der ALK-Level mit Hilfe der quantitativen PCR bestätigen konnte.

In den hier durchgeführten Studien konnte die Relevanz dieses Rezeptors bei der Proliferation von Glioblastom-, Teratokarzinom- und Kolonkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden. Mit Hilfe von dominant-negativen ALK-Verkürzungsmutanten konnte ferner gezeigt werden, dass ein intakter ALK-Rezeptor für die PTN-vermittelten Effekte unentbehrlich ist. Unabhängig von der oft diskutierten Fragestellung der Art der Signaltransduktion von PTN (direkt über ALK oder indirekt via PTPR β/ζ) konnte mit den hier erzielten Resultaten eindeutig die onkogene Relevanz des PTN/ALK-Signalwegs aufgezeigt werden. Es ist potentiell möglich, dass die als alternativer PTN-Rezeptor postulierte Rezeptor-Tyrosinkinase PTPR ζ mit ALK um den gleichen Bindungspartner konkurriert, jedoch weist diese eine deutlich geringere Affinität zum PTN auf und einige Studien zeigen z.B. die PTPR ζ -unabhängige Migrationsstimulation in Glioblastomen (Ulbricht, Eckerich et al. 2006).

Die funktionelle Relevanz im Kolonkarzinom und Teratokarzinom wurde im Gegensatz zu den bereits vormals beschriebenen Auswirkungen auf das Glioblastom (Powers,

Aigner et al. 2002) erst durch die Ergebnisse dieser Arbeit etabliert. Die Tatsache, dass ALK nicht nur in Zellen des Nervensystems eine Rolle bei der Tumorigenität spielt, und das Fehlen von schwerwiegenden Auswirkungen nach dem Entfernen von ALK aus Keimzellen (Li and Morris 2008) machen diesen Rezeptor zu einem attraktiven Ziel für potentielle therapeutische Ansätze. Neben dem hier angewandten stabilen Rz-Targeting und kürzlich durchgeführten Versuchen mit inhibierenden Antikörpern (Stylianou et al., in press) wäre künftig ein RNAi-basiertes, transientes *in vivo*-Targeting, wie für PTN bereits von uns gezeigt (Grzelinski, Bader et al. 2005), sehr für eine therapeutische Behandlung geeignet. Es wären sogar Kombinationen aus RNAi- und Antikörper-basierten Strategien zwecks Synergie denkbar, was von Arbeitskollegen kürzlich für VEGF gezeigt werden konnte (Höbel et al., im Review). Auch das in dieser Arbeit vorgestellte stabile Doppeltargeting von PTN und ALK mit Ribozym-Konstrukten erwies sich als additiv wachstumshemmend für Glioblastome (Grzelinski, Steinberg et al. 2009).

Doppeltargeting

Die Relevanz von PTN und ALK beim Wachstum verschiedener Tumortypen wurde jeweils in den zuvor beschriebenen Studien eindeutig gezeigt. Aufgrund der genetischen Instabilität von Tumorzellen kann in Folge einer autokrinen Gegenregulation das Targeting eines einzelnen Genprodukts für eine therapeutische Zielsetzung nicht ausreichend sein. Hinzu kommt die Problematik der Effizienz der Herunterregulierung, die nicht 100% beträgt und in lebenden Systemen zum Teil nur mäßige Erfolge liefert. Die parallele Ausschaltung von mehr als einem Genprodukt eines Signaltransduktionswegs kann sich potentiell als deutlich effizienter vor allem in Langzeitstudien erweisen. Die zuvor erzielten Proliferationseffekte wurden in der Regel nur mit ausgewählten Zellklonen bestimmter Ribozym-Konstrukte erreicht, die jeweils für die höchsten Targeting-Effizienzen sorgten. Da solche Idealbedingungen zumindest in *in vivo*-Studien nicht immer erreichbar sind und in diesem konkreten Fall alternative Liganden (MK) und Rezeptoren (PTPR β / ζ) involviert sind (Stoica, Kuo et al. 2002; Ulbricht, Brockmann et al. 2003), ist es sowohl für die funktionelle Analyse des

Signalwegs sowie für anschließende therapeutische Erwägungen vom Vorteil, eine Doppeltargeting-Strategie anzuwenden.

Die Wahl von PTN und ALK für Doppeltargeting-Studien beruhte primär auf der eindeutigen Klassifizierung dieser in diversen Tumortypen hochregulierten Moleküle als Wachstumsfaktor/Rezeptor-Paar mit direkter Interaktion in zahlreichen Publikationen (Stoica, Kuo et al. 2001; Lu, Jong et al. 2005). Bei der indirekten Aktivierung dieses Signalwegs via PTPR β / ζ scheint ALK ebenfalls eine Rolle zu spielen (Perez-Pinera, Zhang et al. 2007). Auch der zweite bekannte Vertreter der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren Midkine, der PTN in einem hohen Maße ähnelt, überträgt seine Signale über den ALK-Rezeptor (Stoica, Kuo et al. 2002). Durch die Herunterregulierung von PTN und ALK unterbricht man einerseits den Hauptweg dieser Signaltransduktionskaskade und schließt andererseits alternative Seitenwege mit ein. Dies erlaubt sowohl eine komplexere Untersuchung der funktionellen Relevanz beider Proteine innerhalb ihrer Signaltransduktionskaskade wie auch einen potentiell effizienteren therapeutischen Ansatz.

Eine zusätzliche Variation dieser Wechselwirkungen entsteht durch das Vorkommen zweier PTN-Formen (15 und 18 kDa), die während der post-translationalen Modifikationen entstehen können und auf unterschiedliche Weise agieren. Das PTN-15 aktiviert ALK auf direktem Wege und wirkt proliferationssteigernd, während PTN-18 die haptotaktische Migration von Glioblastomzellen über den alternativen Rezeptor PTPR β / ζ induziert (Lu, Jong et al. 2005). Da diese PTN-Varianten sich jedoch lediglich durch 12 C-terminale Aminosäurereste unterscheiden, wurden sie beide mit den in dieser Arbeit verwendeten Ribozymen spezifisch herunterreguliert.

Die in verschiedenen Zelllinien und Tiermodellen präsentierten Daten ergaben eine verstärkte antitumorigene Wirkung auf Glioblastome und Kolonkarzinome, die einerseits auf verminderter Proliferationsrate und andererseits auf erhöhter Apoptose-Anfälligkeit der behandelten Zellen beruhte. Damit stimmen die Auswirkungen des Doppeltargetings mit den zuvor in anderen Modellen beschriebenen Proliferations-stimulierenden und anti-apoptotischen Eigenschaften des PTN/ALK-Signalwegs überein (Stoica, Kuo et al. 2001; Bowden, Stoica et al. 2002).

Neben der drastischen Verlangsamung des Wachstums von U87MG-Zellen konnte ebenfalls eine Abnahme des „Tumor-Takes“ (Bildung von Tumoren nach der Zellinjektion) beobachtet werden. Viele der Zellinjektionen mit Doppeltargeting-Zellen führten nicht zur Ausbildung von subkutanen Xenotransplantaten. Überraschenderweise führte das Doppeltargeting im Falle einer Ribozym-Kombination sogar zum völligen Verlust der Tumorigenität im Mausmodell, was die funktionelle Relevanz der Wechselwirkung beider Faktoren beim Tumorwachstum belegt.

Die in den letzten Jahren durch die Entdeckung der RNA-Interferenz zunehmend an Bedeutung gewinnenden Gentargeting-Ansätze mit Hilfe von siRNA und miRNA liefern wahrscheinlich eine effizientere Methode des Gen-Knockdowns als Ribozyme (Aigner 2007). Dennoch, wie aus dieser Studie ersichtlich, erlaubt das Ribozym-basierte Doppeltargeting eine sehr potente Herunterregulierung von zwei Genprodukten und besitzt das Potential für eine therapeutische Verwendung. Denkbar wäre auch eine künftige Kombination mit inhibierenden anti-ALK-Antikörpern (Moog-Lutz, Degoutin et al. 2005). Da die Targeting-Effizienz nicht 100% erreicht, begünstigt der additive Effekt die Wirkung in den Tumorzellen. Ferner wurde bereits oft in anderen pharmakologischen Modellen gezeigt, dass die Unterbrechung eines Stoffwechselwegs an zwei Stellen synergistische, gegenregulationshemmende und resistenzverzögernde Effekte hervorrufen kann. Diese Feststellung ist bei der PTN/ALK-Signaltransduktion sehr zutreffend, wenn man an die alternativen Elemente wie MK und PTPR β / ζ denkt. Damit bietet der Ribozym-basierte Doppel-Knockdown von PTN und ALK in neoplastischen Erkrankungen mit hohen Mortalitätsraten und wenigen Behandlungsstrategien einen vielversprechenden Therapieansatz.

PEI/siRNA

Für die funktionelle Analyse von PTN gewährleistet die stabile Transfektion mit Ribozym-Konstrukten zwar eine angemessene Strategie, eine potentielle Therapiemöglichkeit bietet dieser Ansatz jedoch nicht. Um dieser Anforderung zu begegnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Technik des *in vivo*-Targetings mittels PEI eingesetzt, die in der Arbeitsgruppe etabliert und optimiert wurde.

Die Einschleusung von unmodifizierten RNA-Molekülen, wie beispielsweise siRNAs *in vivo*, wurde in der Vergangenheit selten mit vollem Erfolg durchgeführt und stellte sich in vielerlei Hinsicht als sehr schwierig dar. In vielen Fällen wurde die Labilität der zu transportierenden Moleküle durch große Mengen an RNA kompensiert, was oft zu unerwünschten Nebeneffekten führte und eine therapeutische Anwendung im Menschen unmöglich machte. Auch virale Systeme, die in den meisten Fällen ein sehr effizientes Einschleusungswerkzeug für *in vitro*-Versuche darstellen, bringen bei der Humanbehandlung Gefahren mit sich. Viele dieser Methoden erlauben somit kaum ein effizientes Targeting *in vivo* und ermöglichen keine therapeutische Anwendung.

Das initial beim stabilen Ribozym-Targeting verwendete Polyethylenimin erlaubt eine sehr zuverlässige Einschleusung unmodifizierter RNA-Moleküle in lebende Systeme. Dieses nicht-virale Transfektionsreagenz besitzt eine hohe Pufferkapazität und entfaltet in der Zielzelle einen sog. Protonenschwammeffekt (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995), der den Einsatz Endosomen-spaltender Mittel erspart. Das hier eingesetzte JetPEI besitzt eine hohe Transfektionseffizienz bei marginaler Toxizität und erlaubt durch den zuverlässigen Degradationsschutz der transportierten DNA- und RNA-Moleküle eine sehr effiziente Herunterregulierung von Genprodukten. Vor allem bei Arbeiten mit siRNA-basiertem PTN-Targeting, wo sehr degradationsanfällige RNA-Moleküle eingeschleust wurden, hat sich die protektive Eigenschaft von PEI bewährt. Die Funktionalität von PEI beim Ribozym- und siRNA-Targeting wurde in unserem Labor zuvor eingehend überprüft (Brus, Petersen et al. 2004; Urban-Klein, Werth et al. 2005; Aigner 2006a). Die hohen siRNA-Einschleusungseffizienzen von PEI waren entscheidend für die hier durchgeführten *in vivo*-Studien, wo durch PTN-Targeting in bereits ausgebildeten subkutanen Tumor-Xenotransplantaten eine deutliche Wachstumshemmung erzielt werden konnte.

Das von uns zuvor schon eingesetzte Polyethylenimin erlaubt einerseits die Einschleusung intakter Ribozym-Konstrukte in Zellkultur-Transfektionen wie auch andererseits die transiente *in vivo*-Behandlung mit siRNA-Molekülen im Tiermodell (Aigner, Fischer et al. 2002; Urban-Klein, Werth et al. 2005). Diese effiziente, nicht-toxische Methode bedarf keiner chemischen Modifikationen der siRNAs zur

Stabilitätssteigerung und erlaubt es, mit geringen siRNA-Mengen zu arbeiten. Die Bioaktivität der PEI/siRNA-Komplexe konnte sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Ihre spezifische Wirkung konnte trotz transienter Applikationsart über mindestens sieben Tage nach der Applikation detektiert werden.

Glioblastome, die sowohl neu wie auch aus Gliom-Vorläufern gebildet werden können, gehören zu den bösartigsten Gehirntumoren und sind aufgrund ihrer Lage in der Behandlung besonders problematisch. Da Glioblastome in ihrem invasiven Wachstum vor allem auf durch angiogene Wachstumsfaktoren bedingte Gefäßumbildung, Zerstörung des umliegenden Gewebes sowie Migration und Zellmotilität angewiesen sind, liefern Faktoren wie Cathepsin (Gondi, Lakka et al. 2004), VEGF (Jensen 1998) oder PTN geeignete Zielmoleküle für solche Studien. Für PTN konnten bereits in früheren Studien deutlich erhöhte Expressionsraten in Glioblastomen gezeigt werden (Mentlein and Held-Feindt 2002; Muller, Kunkel et al. 2003; Ulbricht, Brockmann et al. 2003; Lu, Jong et al. 2005) und die zuvor erläuterten Daten aus dem stabilen PTN-Targeting (Grzelinski, Bader et al. 2005) belegen die Relevanz dieses Wachstumsfaktors. Die hier verwendeten U87MG zeichnen sich, verglichen mit anderen Glioblastomzelllinien, durch sehr hohe PTN-Expressionsraten und wurden bereits oft bei Studien zum Glioblastoma multiforme verwendet.

Das PEI/siRNA-Targeting wurde zunächst in *in vitro*-Studien durchgeführt und lieferte den Nachweis der Bioaktivität der PEI-Komplexe im Zellkulturmodell. Die U87MG-Zellen zeigten reduziertes kontaktabhängiges Wachstum und es konnte sogar in mehrwöchigen Weichagarexperimenten, die die kontaktunabhängige Proliferation widerspiegeln, eine deutliche Abnahme des Kolonienwachstums erzielt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der zuvor mit Hilfe des stabilen Rz-Targetings durchgeführten Studien und liefern neben ihrer potentiellen therapeutischen Relevanz eine Bestätigung dieser Daten.

Das rapide Wachstum dieser Zelllinie nach der subkutanen Injektion führt zu einer schnellen Ausbildung von Tumorknoten bei athymischen Nacktmäusen und stellt hohe Anforderungen an die Targetingtechniken. Der Einsatz der PEI/siRNA-Technik erlaubte die PTN-Herunterregulierung in bereits ausgebildeten Tumoren im Tiermodell durch

systemische Behandlung und ermöglichte eine sehr zuverlässige Untersuchung der Rolle von PTN beim Tumorwachstum. Die eingeschleusten siRNA-Moleküle entfalteten im Tumor ihre katalytische Aktivität und sorgten für eine solide Herunterregulierung von PTN. In früheren Studien mit radioaktiv markierten PEI-Komplexen konnte ferner die Stabilität nach der Injektion und die systemische Verteilung, die Tumorgewebe einschließt, gezeigt werden (Fischer, Osburg et al. 2004). Die wiederholte Gabe während der Tierexperimente sorgte damit für ein konstantes PTN-Targeting.

Die Applikation der PEI/siRNA-Komplexe erfolgte sowohl intraperitoneal wie auch subkutan, außerhalb des Tumors (proxitumoral). Beide Methoden bewirkten eine deutliche Abnahme des Tumorwachstums der Xenotransplantate im Tiermodell. Die subkutane Gabe lieferte jedoch etwas stabilere Daten und führte zu schnelleren Effekten (siehe Abb. 4.51). Die anschließende Analyse der Gewebeschnitte mit einem Anti-PTN-Antikörper bestätigte die PTN-Herunterregulierung in behandelten Tumoren.

Die Problematik eventueller „off target“-Effekte der verwendeten siRNA-Moleküle wurde durch den Einsatz diverser Kontroll-siRNAs ausgeschlossen. Die in einigen Publikationen zuvor beschriebene potentielle, sequenzspezifische Stimulation der angeborenen Immunabwehr (Hornung, Guenther-Biller et al. 2005; Judge, Sood et al. 2005) wurde einerseits durch die Wahl geeigneter Sequenzen vermieden und andererseits durch die Messung der Konzentration der Zytokine TNF- α und IFN- α adressiert.

Eine Immunstimulation kann generell durch die Verwendung einer ungeeigneten Sequenz mit immunstimulierenden Motiven sowie z.B. durch hohe Mengen an RNA entstehen. Die subzelluläre Lokalisation spielt hierbei ebenfalls eine große Rolle (Sioud 2006a), da die endosomale Lokalisation, die z.B. bei der Lipofektion auftritt, in der Regel mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer unspezifischen Immunantwort führen kann.

Die Einschleusung mittels PEI erlaubt den Einsatz niedriger siRNA-Mengen und gewährleistet durch den Protonenschwammeffekt eine zytoplasmatische Lokalisation

der eingeschleusten Komplexe. Die hier verwendeten doppelsträngigen siRNA-Moleküle gelten ferner als weniger immunstimulierend als ihre einzelsträngigen Pendant (Sioud 2006b). Das zusätzlich als Positivkontrolle verwendete LPS bestätigte unsere Beobachtungen und schloss eine unspezifische Immunantwort in unseren Studien aus.

Die hier verwendete Methode des siRNA-vermittelten Targetings funktioniert sowohl bei der intraperitonealen wie auch bei der subkutanen Applikationsart sehr effizient und spezifisch beim Genknockdown zu Therapiezielen und erweist sich vor allem in Glioblastomen, deren Behandlung sich problematisch gestaltet, als sehr vielversprechend. Die Vorteile dieser Technik konnten außerdem in einer im Rahmen einer Kooperation im Eppendorf-Klinikum durchgeführten Studie am orthotopen Glioblastommodell bestätigt werden. Dort bewirkte die intracraniale Injektion der PEI/siRNA-Komplexe ebenfalls eine Wachstumsreduktion der Glioblastome, was das große Potential dieser Methode bei der künftigen Behandlung von Tumoren unterstreicht.

Studien anderer Arbeitsgruppen zeigen ferner ähnliche Erfolge beim Plasmid-basierten Targeting anderer Faktoren beim Glioblastom (Cathepsin und Urokinase-Plasminogenaktivator) und könnten zukünftig, um additive Effekte zu erzielen, zusammen mit PTN und ALK kombiniert werden (Gondi, Lakka et al. 2004).

Die hier präsentierte erfolgreiche Behandlung von bereits etablierten Tumoren mit PEI/siRNA-Komplexen eröffnet somit völlig neue Perspektiven der antitumoralen Medikation im klinischen Bereich.

Fazit und Ausblick

Zusammenfassend betrachtet stellt PTN einen essentiellen, auto- und parakrinen Wachstumsfaktor für verschiedene Tumorzelllinien *in vitro* dar. Ferner konnte in diversen *in vivo*-Experimenten zusätzlich die Relevanz in soliden Tumoren aufgezeigt werden. Die Überexpression in zahlreichen bösartigen Tumortypen begleitet vom stark limitierten Vorkommen im gesunden Gewebe macht PTN zu einem klinisch relevanten

Zielprotein für einen potentiellen Therapieansatz. Die von uns erzielte Verminderung der PTN-Expression erreichte teilweise bis zu 90% des Ausgangswerts, was eine eingehende Untersuchung der Funktion von PTN auch im Tiermodell erlaubte. Gemeinsam mit seinen teilweise zuvor erforschten Rezeptoren ALK und PTPR β / ζ initiiert PTN einen Signaltransduktionsweg, der unentbehrlich für das Wachstum der hier untersuchten Tumortypen ist und damit ein potentielles therapeutisches Ziel darstellt.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Dissertation die Relevanz des Wachstumsfaktors Pleiotrophin und seines Rezeptors ALK für das Wachstum der Glioblastomzellen und erweitern diese Aussage auf Kolon-CA-Zellen sowie Hoden-CA-Zellen. Es konnte die proliferations- und migrationsstimulierende, angiogene sowie anti-apoptotische Wirkung dieses Signalwegs bestätigt und für neue Zelllinien aufgezeigt werden. Diese Effekte waren in den untersuchten Tumorzelllinien abhängig von der Gendosis beider Faktoren und konnten beim Doppeltargeting teilweise gänzlich unterdrückt werden. Die *in vivo*-Experimente belegten die onkogene Wirkung von PTN und ALK im komplexen biologischen System und das transiente PEI/siRNA-basierte Targeting eröffnet die Perspektive einer vielversprechenden Therapie bereits ausgebildeter Tumoren. Denkbar wäre ebenfalls eine Kombination mit anderen bereits eingesetzten Inhibitionsstrategien (z.B. niedermolekulare Inhibitoren, inhibierende Antikörper, transientes PEI/Ribozym-Targeting) zur effizienten Wachstums- und Metastasenhemmung in der Behandlung von Patienten mit neoplastischen Erkrankungen.

6 Zusammenfassung

Pleiotrophin (PTN) gehört zur Proteinfamilie der sekretierten, heparin-bindenden, Matrix-assoziierten Wachstumsfaktoren und ähnelt funktionell den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Es spielt eine physiologische Rolle während der Ontogenese und ist bei verschiedenen Tumortypen relevant. Die protoonkogene Wirkung von PTN beruht hauptsächlich auf der Stimulation der Proliferation und Angiogenese. Der Rezeptor Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) wurde zunächst im Zusammenhang mit dem großzelligen anaplastischen T-Zell-Lymphom als konstitutiv-aktives, durch chromosomale Aberrationen entstehendes Fusionsprotein entdeckt. In späteren Arbeiten wurde ALK als ein PTN-Rezeptor identifiziert. ALK stellt eine klassische Tyrosinkinase aus der Familie der Insulinrezeptoren dar und seine Liganden-vermittelte Transphosphorylierung führt über weitere Effektoren zur Induktion mehrerer mitogen-aktivierter Signaltransduktionskaskaden, die verantwortlich für sein onkogenes Potential sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von PTN und ALK auf Proliferation, Kolonienbildung im Weichagar, Tumorwachstum, Apoptose und Angiogenese in Glioblastom-, Hoden-CA- und Kolon-CA-Zelllinien untersucht. Zu diesem Zweck wurden im Screening ermittelte PTN- und ALK-positive Zelllinien mit Ribozym-kodierenden Vektoren stabil transfiziert. Die Zellen mit verminderter PTN- bzw. ALK-Expression zeigten eine Verlangsamung der kontaktabhängigen und kontaktunabhängigen Proliferation und bildeten nach s.c. Injektion im Mausmodell kleinere Tumoren. Durch Zugabe von rekombinantem PTN konnten *in vitro* die PTN-Knockdown-Effekte revertiert werden. Es wurden ferner ALK-Verkürzungsmutanten hergestellt und in den Tumorzelllinien überexprimiert. Diese Tyrosinkinase-Domäne-defizienten ALK-Mutanten wirkten sich negativ auf die Proliferationsgeschwindigkeit der Tumorzellen aus. Das Ribozym-vermittelte Doppeltargeting von PTN und ALK in Glioblastom- und Kolon-CA-Zelllinien zeigte sowohl in Zellkulturstudien als auch im *in vivo*-Modell additive antitumorigene Effekte.

Zur Entwicklung von auf diesen Ergebnissen basierenden neuen Therapiestrategien wurde statt des Ribozym-Targetings die RNA-Interferenz (RNAi) eingesetzt. Durch die Verwendung des für *in vivo*-Einschleusung von RNA geeigneten Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) gelang es, in bereits ausgebildeten U87MG-Glioblastom-Tumorexenotransplantaten mittels PEI/siRNA-Komplexen einen PTN-Knockdown zu erzielen, was in einer deutlichen Abnahme des Tumorwachstums resultierte. Diese Behandlung erwies sich sowohl bei intraperitonealer wie auch bei subkutaner Injektion als effizient und spezifisch. Die systemische Gabe von PEI/siRNA-Komplexen zum Knockdown von PTN und / oder ALK stellt somit eine vielversprechende Methode der Behandlung verschiedener solider Tumoren dar.

7 Abstract

Pleiotrophin (PTN) is a member of the protein family of secreted, heparin-binding, matrix-associated growth factors, and functionally resembles fibroblast growth factors. It plays a physiological role during ontogenesis and is relevant in different tumor types. The protooncogenic impact of PTN results mainly from the stimulation of proliferation and angiogenesis. The receptor anaplastic lymphoma kinase (ALK) was initially discovered in connection with the large cell anaplastic T-Cell lymphoma as constitutively active fusion protein resulting from chromosomal aberrations. In later studies, ALK was identified as a PTN-receptor. ALK is a typical tyrosine kinase from the insulin receptor family, and triggers the ligand-specific induction of several mitogene-activated cascades responsible for its oncogenic potential via further protein adapters.

In this study, the influence of PTN and ALK on proliferation, colony-forming in soft agar, tumor growth, apoptosis and angiogenesis in glioblastoma, teratocarcinoma and coloncarcinoma cell lines was investigated. For this purpose, cell lines that were PTN- and ALK-positive in screening experiments were stably transfected with ribozyme-bearing vectors. The cells with reduced PTN or ALK expression displayed a decrease in contact-dependent and contact-independent proliferation, and formed smaller tumor nodes after subcutaneous injection in mice. The effects of the PTN knockdown could be reverted *in vitro* by applying recombinant PTN. For further investigation, truncated mutants of ALK were generated and overexpressed in tumor cell lines. These tyrosine kinase deficient ALK mutants had a negative impact on the proliferation of the tumor cells. The ribozyme mediated double targeting of PTN and ALK showed additive antitumoral effects both in cell culture studies and in *in vivo* models with glioblastoma and colon carcinoma cell lines.

To develop novel therapeutic strategies based on these results, we used RNA interference (RNAi) instead of ribozyme targeting. Using the transfection reagent polyethyleneimine (PEI), which is suitable for the delivery of RNA, we succeeded in knocking down PTN by means of PEI/siRNA complexes in established U87MG

glioblastoma tumor xenotransplants, with a subsequent considerable reduction of tumor growth. This treatment worked both very efficiently and specifically with intraperitoneal, as well as with subcutaneous injections. The systemic administration of PEI/siRNA complexes in order to knock down PTN and / or ALK thus represents a promising treatment method for different solid tumors.

8 Literaturverzeichnis

- Abdelmaksoud, H. E., Yau, E. H., Zuker, M. and Sullivan, J. M. (2008). "Development of lead hammerhead ribozyme candidates against human rod opsin mRNA for retinal degeneration therapy." Exp Eye Res.
- Aigner, A. (2006a). "Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo." J Biomed Biotechnol **2006**(4): 71659.
- Aigner, A. (2006b). "Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs." J Biotechnol.
- Aigner, A. (2007). "Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo." Appl Microbiol Biotechnol **76**(1): 9-21.
- Aigner, A., Brachmann, P., Beyer, J., Jager, R., Raulais, D., Vigny, M., Neubauer, A., Heidenreich, A., Weinknecht, S., Czubyko, F. and Zugmaier, G. (2003). "Marked increase of the growth factors pleiotrophin and fibroblast growth factor-2 in serum of testicular cancer patients." Ann Oncol **14**(10): 1525-9.
- Aigner, A., Fischer, D., Merdan, T., Brus, C., Kissel, T. and Czubyko, F. (2002). "Delivery of unmodified bioactive ribozymes by an RNA-stabilizing polyethylenimine (LMW-PEI) efficiently down-regulates gene expression." Gene Ther **9**(24): 1700-7.
- Aigner, A., Juhl, H., Malerczyk, C., Tkybusch, A., Benz, C. C. and Czubyko, F. (2001). "Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation." Oncogene **20**(17): 2101-11.
- Ambrogio, C., Voena, C., Manazza, A. D., Piva, R., Riera, L., Barberis, L., Costa, C., Tarone, G., Defilippi, P., Hirsch, E., Boeri Erba, E., Mohammed, S., Jensen, O. N., Palestro, G., Inghirami, G. and Chiarle, R. (2005). "p130Cas mediates the transforming properties of the anaplastic lymphoma kinase." Blood **106**(12): 3907-16.
- Amet, L. E., Lauri, S. E., Hienola, A., Croll, S. D., Lu, Y., Levorse, J. M., Prabhakaran, B., Taira, T., Rauvala, H. and Vogt, T. F. (2001). "Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule." Mol Cell Neurosci **17**(6): 1014-24.
- Antoine, M., Tag, C. G., Wirz, W., Borkham-Kamphorst, E., Sawitza, I., Gressner, A. M. and Kiefer, P. (2005). "Upregulation of pleiotrophin expression in rat hepatic stellate cells by PDGF and hypoxia: implications for its role in experimental biliary liver fibrogenesis." Biochem Biophys Res Commun **337**(4): 1153-64.
- Armstrong, F., Duplantier, M. M., Tremplat, P., Hieblot, C., Lamant, L., Espinos, E., Racaud-Sultan, C., Allouche, M., Campo, E., Delsol, G. and Touriol, C. (2004). "Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells." Oncogene **23**(36): 6071-82.
- Astsaturov, I., Cohen, R. B. and Harari, P. M. (2006). "EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer." Curr Cancer Drug Targets **6**(8): 691-710.
- Bai, R. Y., Dieter, P., Peschel, C., Morris, S. W. and Duyster, J. (1998). "Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity." Mol Cell Biol **18**(12): 6951-61.
- Bai, R. Y., Ouyang, T., Miething, C., Morris, S. W., Peschel, C. and Duyster, J. (2000). "Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-

- cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway." Blood **96**(13): 4319-27.
- Barbacid, M. (1995). "Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors." Ann N Y Acad Sci **766**: 442-58.
- Barthlen, W., Flaadt, D., Girgert, R., Conzelmann, J., Schweizer, P., Zugmaier, G., Buck, M. and Knabbe, C. (2003). "Significance of heparin-binding growth factor expression on cells of solid pediatric tumors." J Pediatr Surg **38**(9): 1296-304.
- Behr, J. P. (1997). "The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the viruses Did Not Exploit." Chimia **51**: 34-36.
- Benharroch, D., Meguerian-Bedoyan, Z., Lamant, L., Amin, C., Brugieres, L., Terrier-Lacombe, M. J., Haralambieva, E., Pulford, K., Pileri, S., Morris, S. W., Mason, D. Y. and Delsol, G. (1998). "ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology." Blood **91**(6): 2076-84.
- Bernard-Pierrot, I., Delbe, J., Rouet, V., Vigny, M., Kerros, M. E., Caruelle, D., Raulais, D., Barritault, D., Courty, J. and Milhiet, P. E. (2002). "Dominant negative effectors of heparin affin regulatory peptide (HARP) angiogenic and transforming activities." J Biol Chem **277**(35): 32071-7.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-6.
- Bischof, D., Pulford, K., Mason, D. Y. and Morris, S. W. (1997). "Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis." Mol Cell Biol **17**: 2312-2325.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. and Barik, S. (2005). "Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA." Nat Med **11**(1): 50-5.
- Bloch, B., Normand, E., Kovesdi, I. and Böhlen, P. (1992). "Expression of the HBNF (heparin-binding neurite-promoting factor) gene in the brain of fetal, neonatal and adult rat: an in situ hybridization study." Brain Res Dev Brain Res **70**: 267-278.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-65.
- Böhlen, P. and Kovesdi, I. (1991). "HBNF and MK, members of a novel gene family of heparin-binding proteins with potential roles in embryogenesis and brain function." Prog.Growth Factor.Res. **3**: 143-157.
- Böhlen, P., Müller, T., Gautschi-Sova, P., Albrecht, U., Rasool, C. G., Decker, M., Seddon, A., Fafeur, V., Kovesdi, I. and Kretschmer, P. (1991). "Isolation from bovine brain and structural characterization of HBNF, a heparin-binding neurotrophic factor." Growth Factors. **4**: 97-107.
- Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M. and Nigg, E. A. (1989). "Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm." Cell **56**(3): 379-90.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-301.
- Bowden, E. T., Stoica, G. E. and Wellstein, A. (2002). "Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase." J Biol Chem **277**(39): 35862-8.
- Brunet-de Carvalho, N., Raulais, D., Rauvala, H., Souttou, B. and Vigny, M. (2003). "HB-GAM/Pleiotrophin and Midkine are differently expressed and distributed

- during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 cells." Growth Factors **21**(3-4): 139-49.
- Brus, C., Petersen, H., Aigner, A., Czubyko, F. and Kissel, T. (2004). "Physicochemical and biological characterization of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers as a delivery system for oligonucleotides and ribozymes." Bioconjug Chem **15**(4): 677-84.
- Bullrich, F., Morris, S. W., Hummel, M., Pileri, S., Stein, H. and Croce, C. M. (1994). "Nucleophosmin (NPM) gene rearrangements in Ki-1-positive lymphomas." Cancer Res **54**(11): 2873-7.
- Calin, G. A. and Croce, C. M. (2006). "MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale." Cancer Res **66**(15): 7390-4.
- Cao, G., Qian, Y. W., Kowala, M. C. and Konrad, R. J. (2008). "Further LDL cholesterol lowering through targeting PCSK9 for coronary artery disease." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **8**(4): 238-43.
- Carrato, A., Gallego-Plazas, J. and Guillen-Ponce, C. (2006). "Anti-VEGF therapy: a new approach to colorectal cancer therapy." Expert Rev Anticancer Ther **6**(10): 1385-96.
- Cech, T. R., Zaug, A. J. and Grabowski, P. J. (1981). "In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence." Cell **27**(3 Pt 2): 487-96.
- Cessna, M. H., Zhou, H., Sanger, W. G., Perkins, S. L., Tripp, S., Pickering, D., Daines, C. and Coffin, C. M. (2002). "Expression of ALK1 and p80 in inflammatory myofibroblastic tumor and its mesenchymal mimics: a study of 135 cases." Mod Pathol **15**(9): 931-8.
- Chang, Y., Zuka, M., Perez-Pinera, P., Astudillo, A., Mortimer, J., Berenson, J. R. and Deuel, T. F. (2007). "Secretion of pleiotrophin stimulates breast cancer progression through remodeling of the tumor microenvironment." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(26): 10888-93.
- Chauhan, A. K., Li, Y. S. and Deuel, T. F. (1993). "Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **90**: 679-682.
- Chen, H., Campbell, R. A., Chang, Y., Li, M., Wang, C. S., Li, J., Sanchez, E., Share, M., Steinberg, J., Berenson, A., Shalitin, D., Zeng, Z., Gui, D., Perez-Pinera, P., Berenson, R. J., Said, J., Bonavida, B., Deuel, T. F. and Berenson, J. R. (2009). "Pleiotrophin produced by multiple myeloma induces transdifferentiation of monocytes into vascular endothelial cells: a novel mechanism of tumor-induced vasculogenesis." Blood **113**(9): 1992-2002.
- Chen, H., Gordon, M. S., Campbell, R. A., Li, M., Wang, C. S., Lee, H. J., Sanchez, E., Manyak, S. J., Gui, D., Shalitin, D., Said, J., Chang, Y., Deuel, T. F., Baritaki, S., Bonavida, B. and Berenson, J. R. (2007). "Pleiotrophin is highly expressed by myeloma cells and promotes myeloma tumor growth." Blood **110**(1): 287-95.
- Chen, H., Rubin, E., Zhang, H., Chung, S., Jie, C. C., Garrett, E., Biswal, S. and Sukumar, S. (2005). "Identification of transcriptional targets of HOXA5." J Biol Chem **280**(19): 19373-80.
- Chi, J. T., Chang, H. Y., Wang, N. N., Chang, D. S., Dunphy, N. and Brown, P. O. (2003). "Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6343-6.
- Chiarle, R., Gong, J. Z., Guasparri, I., Pesci, A., Cai, J., Liu, J., Simmons, W. J., Dhall, G., Howes, J., Piva, R. and Inghirami, G. (2003). "NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors." Blood **101**(5): 1919-27.

- Chiarle, R., Simmons, W. J., Cai, H., Dhall, G., Zamo, A., Raz, R., Karras, J. G., Levy, D. E. and Inghirami, G. (2005). "Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target." Nat Med **11**(6): 623-9.
- Chopra, V., Dinh, T. V. and Hannigan, E. V. (1996). "Angiogenin, interleukins, and growth-factor levels in serum of patients with ovarian cancer: correlation with angiogenesis." Cancer J Sci Am **2**(5): 279-85.
- Chopra, V., Dinh, T. V. and Hannigan, E. V. (1998). "Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer." Cancer Invest **16**(3): 152-9.
- Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Ziche, M. and Bicknell, R. (1997). "An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis." Cancer Res. **57**: 1814-1819.
- Choudhuri, R., Zhang, H. T., Ziche, M. and Bicknell, R. (1996). "The neurotrophins midkine and pleiotrophin are angiogenic and promote tumor growth." Proc Am Assoc Cancer Res **38**: 400.
- Christman, K. L., Fang, Q., Kim, A. J., Sievers, R. E., Fok, H. H., Candia, A. F., Colley, K. J., Herradon, G., Ezquerro, L., Deuel, T. F. and Lee, R. J. (2005a). "Pleiotrophin induces formation of functional neovasculature in vivo." Biochem Biophys Res Commun **332**(4): 1146-52.
- Christman, K. L., Fang, Q., Yee, M. S., Johnson, K. R., Sievers, R. E. and Lee, R. J. (2005b). "Enhanced neovasculature formation in ischemic myocardium following delivery of pleiotrophin plasmid in a biopolymer." Biomaterials **26**(10): 1139-44.
- Coburn, G. A. and Cullen, B. R. (2002). "Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference." J Virol **76**(18): 9225-31.
- Cordell, J. L., Pulford, K. A., Bigerna, B., Roncador, G., Banham, A., Colombo, E., Pelicci, P. G., Mason, D. Y. and Falini, B. (1999). "Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells." Blood **93**(2): 632-42.
- Courtney, E. D., Melville, D. M. and Leicester, R. J. (2004). "Review article: chemoprevention of colorectal cancer." Aliment Pharmacol Ther **19**(1): 1-24.
- Courty, J., Dauchel, M. C., Caruelle, D., Nguyen, T. T. and Barritault, D. (1991a). "Purification and characterization of a new endothelial cell growth factor named HARP (Heparin Affin Regulatory Peptide)." J Cell Biochem **15F**: Abstr. 221.
- Courty, J., Dauchel, M. C., Caruelle, D., Perderiset, M. and Barritault, D. (1991b). "Mitogenic properties of a new endothelial cell growth factor related to pleiotrophin." Biochem.Biophys.Res.Commun. **180**: 145-151.
- Culy, C. (2005). "Bevacizumab: antiangiogenic cancer therapy." Drugs Today (Barc) **41**(1): 23-36.
- Czubayko, F., Liaudet-Coopman, E. D. E., Berchem, G. J. and Wellstein, A. (1996). Ribozyme-targeting elucidates a role in tumor growth of a secreted binding protein for basic FGF.
- Czubayko, F., Riegel, A. T. and Wellstein, A. (1994). "Ribozyme-targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth." J Biol Chem **269**(33): 21358-63.
- Czubayko, F., Schulte, A. M., Berchem, G. J. and Wellstein, A. (1996). "Melanoma angiogenesis and metastasis modulated by ribozyme targeting of the secreted growth factor pleiotrophin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14753-8.

- Czubayko, F., Smith, R. V., Chung, H. C. and Wellstein, A. (1994). "Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors." J.Biol.Chem. **269**: 28243-28248.
- Czubayko, F. and Wellstein, A. (1994). "Expression of the growth factor pleiotrophin in human tumor tissues." unpublished.
- Davies, J. M. and Goldberg, R. M. (2008). "First-line therapeutic strategies in metastatic colorectal cancer." Oncology (Williston Park) **22**(13): 1470-9.
- Dean, R. A., Butler, G. S., Hamma-Kourbali, Y., Delbe, J., Brigstock, D. R., Courty, J. and Overall, C. M. (2007). "Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis." Mol Cell Biol **27**(24): 8454-65.
- Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O. and Sugahara, K. (2004). "Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor." J Biol Chem **279**(36): 37368-76.
- Delbe, J., Vacherot, F., Laaroubi, K., Barritault, D. and Courty, J. (1995). "Effect of heparin on bovine epithelial lens cell proliferation induced by heparin affinity regulatory peptide." J Cell.Physiol **164**: 47-54.
- Delsol, G., Lamant, L., Mariame, B., Pulford, K., Dastugue, N., Brousset, P., Rigal-Huguet, F., al Saati, T., Cerretti, D. P., Morris, S. W. and Mason, D. Y. (1997). "A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation." Blood **89**: 1483-1490.
- Deuel, T. F., Zhang, N., Yeh, H. J., Silos-Santiago, I. and Wang, Z. Y. (2002). "Pleiotrophin: a cytokine with diverse functions and a novel signaling pathway." Arch Biochem Biophys **397**(2): 162-71.
- Devouassoux-Shisheboran, M., Mauduit, C., Tabone, E., Droz, J. P. and Benahmed, M. (2003). "Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours." Apmis **111**(1): 212-24; discussion 224.
- Dirks, W. G., Fahnrich, S., Lis, Y., Becker, E., MacLeod, R. A. and Drexler, H. G. (2002). "Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines." Int J Cancer **100**(1): 49-56.
- Dolzanskaya, N., Conti, J., Schwenk, V., Merz, G. and Denman, R. B. (2001). "Self-cleaving-ribozyme-mediated reduction of betaAPP in human rhabdomyosarcoma cells." Arch Biochem Biophys **387**(2): 223-32.
- Drexler, H. G., Gignac, S. M., von Wasielewski, R., Werner, M. and Dirks, W. G. (2000). "Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas." Leukemia **14**(9): 1533-59.
- Duyster, J., Bai, R. Y. and Morris, S. W. (2001). "Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK)." Oncogene **20**(40): 5623-37.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.

- Englund, C., Loren, C. E., Grabbe, C., Varshney, G. K., Deleuil, F., Hallberg, B. and Palmer, R. H. (2003). "Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion." Nature **425**(6957): 512-6.
- Ezquerro, L., Herradon, G., Nguyen, T., Vogt, T. F., Bronson, R., Silos-Santiago, I. and Deuel, T. F. (2004). "Pleiotrophin is a major regulator of the catecholamine biosynthesis pathway in mouse aorta." Biochem Biophys Res Commun **323**(2): 512-7.
- Falini, B., Bigerna, B., Fizzotti, M., Pulford, K., Pileri, S. A., Delsol, G., Carbone, A., Paulli, M., Magrini, U., Menestrina, F., Giardini, R., Pilotti, S., Mezzelani, A., Ugolini, B., Billi, M., Pucciarini, A., Pacini, R., Pelicci, P. G. and Flenghi, L. (1998). "ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum." Am J Pathol **153**(3): 875-86.
- Falini, B., Pileri, S., Zinzani, P. L., Carbone, A., Zagonel, V., Wolf-Peeters, C., Verhoef, G., Menestrina, F., Todeschini, G., Paulli, M., Lazzarino, M., Giardini, R., Aiello, A., Foss, H. D., Araujo, I., Fizzotti, M., Pelicci, P. G., Flenghi, L., Martelli, M. F. and Santucci, A. (1999). "ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome." Blood **93**(8): 2697-706.
- Falini, B., Pulford, K., Pucciarini, A., Carbone, A., De Wolf-Peeters, C., Cordell, J., Fizzotti, M., Santucci, A., Pelicci, P. G., Pileri, S., Campo, E., Ott, G., Delsol, G. and Mason, D. Y. (1999). "Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK." Blood **94**(10): 3509-15.
- Fan, Q. W., Muramatsu, T. and Kadomatsu, K. (2000). "Distinct expression of midkine and pleiotrophin in the spinal cord and placental tissues during early mouse development." Dev Growth Differ **42**(2): 113-9.
- Fang, W., Hartmann, N., Chow, D. T., Riegel, A. T. and Wellstein, A. (1992). "Pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and is expressed in human cancer." J.Biol.Chem. **267**: 25889-25897.
- Fanin, R., Silvestri, F., Geromin, A., Cerno, M., Infanti, L., Zaja, F., Barillari, G., Savignano, C., Rinaldi, C., Damiani, D., Buffoli, A., Biffoni, F. and Baccarini, M. (1996). "Primary systemic CD30 (Ki-1)-positive anaplastic large cell lymphoma of the adult: sequential intensive treatment with the F-MACHOP regimen (+/- radiotherapy) and autologous bone marrow transplantation." Blood **87**(4): 1243-8.
- Fantl, W. J., Johnson, D. E. and Williams, L. T. (1993). "Signalling by receptor tyrosine kinases." Annu Rev Biochem **62**: 453-81.
- Fell, P. L., Hudson, A. J., Reynolds, M. A., Usman, N. and Akhtar, S. (1997). "Cellular uptake properties of a 2'-amino/2'-O-methyl-modified chimeric hammerhead ribozyme targeted to the epidermal growth factor receptor mRNA." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(4): 319-26.
- Fiorani, C., Vinci, G., Sacchi, S., Bonaccorsi, G. and Artusi, T. (2001). "Primary systemic anaplastic large-cell lymphoma (CD30+): advances in biology and current therapeutic approaches." Clin Lymphoma **2**(1): 29-37; discussion 38-9.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Fischer, D., Osburg, B., Petersen, H., Kissel, T. and Bickel, U. (2004). "Effect of poly(ethylene imine) molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice." Drug Metab Dispos **32**(9): 983-92.

- Folkman, J. (2006). "Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action." Exp Cell Res **312**(5): 594-607.
- Forster, A. C. and Symons, R. H. (1987). "Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites." Cell **49**(2): 211-20.
- Foster, G. R. (2004). "Past, present, and future hepatitis C treatments." Semin Liver Dis **24 Suppl 2**: 97-104.
- Fujimoto, J., Shiota, M., Iwahara, T., Seki, N., Satoh, H., Mori, S. and Yamamoto, T. (1996). "Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5)." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4181-6.
- Garver, R. I., Jr., Chan, C. S. and Milner, P. G. (1993). "Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues." Am.J Respir.Cell Mol.Biol **9**: 463-466.
- Garver, R. I., Jr., Radford, D. M., Donis-Keller, H., Wick, M. R. and Milner, P. G. (1994). "Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue." Cancer **74**: 1584-1590.
- Gascoyne, R. D., Aoun, P., Wu, D., Chhanabhai, M., Skinnider, B. F., Greiner, T. C., Morris, S. W., Connors, J. M., Vose, J. M., Viswanatha, D. S., Coldman, A. and Weisenburger, D. D. (1999). "Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma." Blood **93**(11): 3913-21.
- Gascoyne, R. D., Lamant, L., Martin-Subero, J. I., Lestou, V. S., Harris, N. L., Muller-Hermelink, H. K., Seymour, J. F., Campbell, L. J., Horsman, D. E., Auvigne, I., Espinos, E., Siebert, R. and Delsol, G. (2003). "ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases." Blood **102**(7): 2568-73.
- Godbey, W. T., Barry, M. A., Saggau, P., Wu, K. K. and Mikos, A. G. (2000). "Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery." J Biomed Mater Res **51**(3): 321-8.
- Gondi, C. S., Lakka, S. S., Dinh, D. H., Olivero, W. C., Gujrati, M. and Rao, J. S. (2004). "RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas." Oncogene **23**(52): 8486-96.
- Greenland, C., Touriol, C., Chevillard, G., Morris, S. W., Bai, R., Duyster, J., Delsol, G. and Allouche, M. (2001). "Expression of the oncogenic NPM-ALK chimeric protein in human lymphoid T-cells inhibits drug-induced, but not Fas-induced apoptosis." Oncogene **20**(50): 7386-97.
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K. and Pandolfi, P. P. (2005). "Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis." Nature **437**(7055): 147-53.
- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. and Pandolfi, P. P. (2006). "Nucleophosmin and cancer." Nat Rev Cancer **6**(7): 493-505.
- Grzelinski, M., Bader, N., Czubayko, F. and Aigner, A. (2005). "Ribozyme-targeting reveals the rate-limiting role of pleiotrophin in glioblastoma." Int J Cancer.
- Grzelinski, M., Steinberg, F., Martens, T., Czubayko, F., Lamszus, K. and Aigner, A. (2009). "Enhanced antitumorigenic effects in glioblastoma on double targeting of pleiotrophin and its receptor ALK." Neoplasia **11**(2): 145-56.
- Gu, T. L., Tothova, Z., Scheijen, B., Griffin, J. D., Gilliland, D. G. and Sternberg, D. W. (2004). "NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates

- survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a." Blood **103**(12): 4622-9.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983). "The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme." Cell **35**(3 Pt 2): 849-57.
- Guittat, L., Alberti, P., Gomez, D., De Cian, A., Pennarun, G., Lemarteleur, T., Belmokhtar, C., Paterski, R., Morjani, H., Trentesaux, C., Mandine, E., Boussin, F., Mailliet, P., Lacroix, L., Riou, J. F. and Mergny, J. L. (2004). "Targeting human telomerase for cancer therapeutics." Cytotechnology **45**(1-2): 75-90.
- Hamasaki, K., Nakao, K., Matsumoto, K., Ichikawa, T., Ishikawa, H. and Eguchi, K. (2003). "Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication." FEBS Lett **543**(1-3): 51-4.
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science **286**(5441): 950-2.
- Hamma-Kourbali, Y., Bernard-Pierrot, I., Heroult, M., Dalle, S., Caruelle, D., Milhiet, P. E., Fernig, D. G., Delbe, J. and Courty, J. (2008). "Inhibition of the mitogenic, angiogenic and tumorigenic activities of pleiotrophin by a synthetic peptide corresponding to its C-thrombospondin repeat-I domain." J Cell Physiol **214**(1): 250-9.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature **404**(6775): 293-6.
- Hampton, B. S., Marshak, D. R. and Burgess, W. H. (1992). "Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule." Mol.Biol.Cell **3**: 85-93.
- Hao, Z. M., Luo, J. Y., Cheng, J., Wang, Q. Y. and Yang, G. X. (2003). "Design of a ribozyme targeting human telomerase reverse transcriptase and cloning of it's gene." World J Gastroenterol **9**(1): 104-7.
- Haseloff, J. and Gerlach, W. L. (1988). "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities." Nature **334**: 585-591.
- Haseloff, J. and Gerlach, W. L. (1989). "Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus." Gene **82**: 43-52.
- Hatziapostolou, M., Delbe, J., Katsoris, P., Polytharchou, C., Courty, J. and Papadimitriou, E. (2005). "Heparin affin regulatory peptide is a key player in prostate cancer cell growth and angiogenicity." Prostate **65**(2): 151-8.
- Hatziapostolou, M., Polytharchou, C., Katsoris, P., Courty, J. and Papadimitriou, E. (2006). "Heparin affin regulatory peptide/pleiotrophin mediates fibroblast growth factor 2 stimulatory effects on human prostate cancer cells." J Biol Chem **281**(43): 32217-26.
- Haupt, S. and Haupt, Y. (2006). "Importance of p53 for cancer onset and therapy." Anticancer Drugs **17**(7): 725-32.
- Hernandez, L., Pinyol, M., Hernandez, S., Bea, S., Pulford, K., Rosenwald, A., Lamant, L., Falini, B., Ott, G., Mason, D. Y., Delsol, G. and Campo, E. (1999). "TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations." Blood **94**(9): 3265-8.
- Heroult, M., Bernard-Pierrot, I., Delbe, J., Hamma-Kourbali, Y., Katsoris, P., Barritault, D., Papadimitriou, E., Plouet, J. and Courty, J. (2004). "Heparin affin regulatory peptide binds to vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis." Oncogene **23**(9): 1745-53.

- Herradon, G., Ezquerra, L., Nguyen, T., Vogt, T. F., Bronson, R., Silos-Santiago, I. and Deuel, T. F. (2004). "Pleiotrophin is an important regulator of the renin-angiotensin system in mouse aorta." Biochem Biophys Res Commun **324**(3): 1041-7.
- Hoffmann, M., Schmidt, M. and Wels, W. (1998). "Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha." Cancer Immunol Immunother **47**(3): 167-75.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., Endres, S. and Hartmann, G. (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat Med **11**(3): 263-70.
- Houldsworth, J., Korkola, J. E., Bosl, G. J. and Chaganti, R. S. (2006). "Biology and genetics of adult male germ cell tumors." J Clin Oncol **24**(35): 5512-8.
- Hu, Y. C., Liu, M. L., Li, G., Huo, Y. Y. and Wu, D. C. (2006). "[A pleiotrophin-specific siRNA and its effect on PTEN-/- MEF241 cells]." Ai Zheng **25**(10): 1210-5.
- Hurley, S. P., Clary, D. O., Copie, V. and Lefcort, F. (2006). "Anaplastic lymphoma kinase is dynamically expressed on subsets of motor neurons and in the peripheral nervous system." J Comp Neurol **495**(2): 202-12.
- Hurwitz, H. (2004). "Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer." Clin Colorectal Cancer **4 Suppl 2**: S62-8.
- Imai, S., Kaksonen, M., Raulo, E., Kinnunen, T., Fages, C., Meng, X., Lakso, M. and Rauvala, H. (1998). "Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)." J Cell Biol **143**(4): 1113-28.
- Iseki, K., Hagino, S., Mori, T., Zhang, Y., Yokoya, S., Takaki, H., Tase, C., Murakawa, M. and Wanaka, A. (2002). "Increased syndecan expression by pleiotrophin and FGF receptor-expressing astrocytes in injured brain tissue." Glia **39**(1): 1-9.
- Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B. and Yamamoto, T. (1997). "Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system." Oncogene **14**: 439-449.
- Jacque, J. M., Triques, K. and Stevenson, M. (2002). "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." Nature **418**(6896): 435-8.
- Jager, R., Hahne, J., Jacob, A., Egert, A., Schenkel, J., Wernert, N., Schorle, H. and Wellmann, A. (2005). "Mice transgenic for NPM-ALK develop non-Hodgkin lymphomas." Anticancer Res **25**(5): 3191-6.
- Jager, R., List, B., Knabbe, C., Souttou, B., Raulais, D., Zeiler, T., Wellstein, A., Aigner, A., Neubauer, A. and Zugmaier, G. (2002). "Serum levels of the angiogenic factor pleiotrophin in relation to disease stage in lung cancer patients." Br J Cancer **86**(6): 858-63.
- Jager, R., Noll, K., Havemann, K., Pfluger, K. H., Knabbe, C., Rauvala, H. and Zugmaier, G. (1997). "Differential expression and biological activity of the heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in lung cancer cell lines." Int J Cancer **73**(4): 537-43.
- Jean, G. W. and Shah, S. R. (2008). "Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer." Pharmacotherapy **28**(6): 742-54.

- Jensen, R. L. (1998). "Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review." Surg Neurol **49**(2): 189-95; discussion 196.
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K. and MacLachlan, I. (2005). "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." Nat Biotechnol **23**(4): 457-62.
- Kadomatsu, K. (2005). "The midkine family in cancer, inflammation and neural development." Nagoya J Med Sci **67**(3-4): 71-82.
- Kadomatsu, K. and Muramatsu, T. (2004). "Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer." Cancer Lett **204**(2): 127-43.
- Kalofonos, H. P. and Grivas, P. D. (2006). "Monoclonal antibodies in the management of solid tumors." Curr Top Med Chem **6**(16): 1687-705.
- Kapadia, S. B., Brideau-Andersen, A. and Chisari, F. V. (2003). "Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 2014-8.
- Kashani-Sabet, M., Liu, Y., Fong, S., Desprez, P. Y., Liu, S., Tu, G., Nosrati, M., Handumrongkul, C., Liggitt, D., Thor, A. D. and Debs, R. J. (2002). "Identification of gene function and functional pathways by systemic plasmid-based ribozyme targeting in adult mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3878-83.
- Kawachi, H., Fujikawa, A., Maeda, N. and Noda, M. (2001). "Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase zeta /beta by the yeast substrate-trapping system." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6593-8.
- Kilpelainen, I., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Avikainen, H., Fath, M., Linhardt, R. J., Raulo, E. and Rauvala, H. (2000). "Heparin-binding growth-associated molecule contains two heparin-binding beta -sheet domains that are homologous to the thrombospondin type I repeat." J Biol Chem **275**(18): 13564-70.
- Kleihues, P. and Ohgaki, H. (2000). "Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors." Toxicol Pathol **28**(1): 164-70.
- Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., Albuquerque, R. J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Kariko, K., Ambati, B. K., Wilgus, T. A., DiPietro, L. A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J. R., Taylor, E. W. and Ambati, J. (2008). "Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3." Nature **452**(7187): 591-7.
- Klomp, H. J., Zernial, O., Flachmann, S., Wellstein, A. and Juhl, H. (2002). "Significance of the expression of the growth factor pleiotrophin in pancreatic cancer patients." Clin Cancer Res **8**(3): 823-7.
- Kojima, S., Inui, T., Kimura, T., Sakakibara, S., Muramatsu, H., Amanuma, H., Maruta, H. and Muramatsu, T. (1995). "Synthetic peptides derived from midkine enhance plasminogen activator activity in bovine aortic endothelial cells." Biochem.Biophys.ResCommun. **206**: 468-473.
- Kojima, T., Katsumi, A., Yamazaki, T., Muramatsu, T., Nagasaka, T., Ohsumi, K. and Saito, H. (1996). "Human ryudocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor." J Biol Chem. **271**: 5914-5920.
- Kolibaba, K. S. and Druker, B. J. (1997). "Protein tyrosine kinases and cancer." Biochim Biophys Acta **1333**(3): F217-48.
- Kovesdi, I., Fairhurst, J. L., Kretschmer, P. J. and Böhlen, P. (1990). "Heparin-binding neurotrophic factor (HBNF) and MK, members of a new family of homologous,

- developmentally regulated proteins." Biochem.Biophys.Res.Comm. **172**: 850-854.
- Krausz, C. and Looijenga, L. H. (2008). "Genetic aspects of testicular germ cell tumors." Cell Cycle **7**(22): 3519-24.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. and Cech, T. R. (1982). "Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena." Cell **31**: 147-157.
- Kuefer, M. U., Look, A. T., Pulford, K., Behm, F. G., Pattengale, P. K., Mason, D. Y. and Morris, S. W. (1997). "Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice." Blood **90**(8): 2901-10.
- Kumar, A. (2008). "RNA interference: a multifaceted innate antiviral defense." Retrovirology **5**: 17.
- Kuo, M. D., Huang, S. S. and Huang, J. S. (1990). "Acidic fibroblast growth factor receptor purified from bovine liver is a novel protein tyrosine kinase." J.Biol.Chem. **265**: 16455-16463.
- Kuo, M. D., Huang, S. S. and Huang, J. S. (1992). "Characterization of heparin-binding growth-associated factor receptor on NIH 3T3 cells." Biochem.Biophys.Res.Comm. **182**: 188-194.
- Kuo, M. D., Oda, Y., Huang, J. S. and Huang, S. S. (1990). "Amino acid sequence and characterization of a heparin-binding neurite-promoting factor (p18) from bovine brain." J.Biol.Chem. **265**: 18749-18752.
- Kuroi, K. and Toi, M. (2001). "Circulating angiogenesis regulators in cancer patients." Int J Biol Markers **16**(1): 5-26.
- Kurtz, A., Schulte, A. M. and Wellstein, A. (1995). "Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology." Crit.Rev Oncog. **6**: 151-177.
- Kwabi-Addo, B., Ozen, M. and Ittmann, M. (2004). "The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer." Endocr Relat Cancer **11**(4): 709-24.
- Laaroubi, K., Delbe, J., Vacherot, F., Desgranges, P., Tardieu, M., Jaye, M., Barritault, D. and Courty, J. (1994). "Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affin regulatory peptide." Growth Factors **10**: 89-98.
- Lai, C. and Lemke, G. (1991). "An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system." Neuron **6**: 691-704.
- Lai, S., Czubayko, F., Riegel, A. T. and Wellstein, A. (1992). "Structure of the human heparin-binding growth factor gene pleiotrophin." Biochem.Biophys.Res.Comm. **187**: 1113-1122.
- Lamant, L., Pulford, K., Bischof, D., Morris, S. W., Mason, D. Y., Delsol, G. and Mariame, B. (2000). "Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma." Am J Pathol **156**(5): 1711-21.
- Lange, K., Uckert, W., Blankenstein, T., Nadrowitz, R., Bittner, C., Renauld, J. C., van Snick, J., Feller, A. C. and Merz, H. (2003). "Overexpression of NPM-ALK induces different types of malignant lymphomas in IL-9 transgenic mice." Oncogene **22**(4): 517-27.
- Lauri, S. E., Taira, T., Kaila, K. and Rauvala, H. (1996). "Activity-induced enhancement of HB-GAM expression in rat hippocampal slices." Neuroreport **7**: 1670-1674.
- Lee, H. H., Norris, A., Weiss, J. B. and Frasch, M. (2003). "Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers." Nature **425**(6957): 507-12.

- Lehmann, W., Schinke, T., Schilling, A. F., Catala-Lehnen, P., Gebauer, M., Pogoda, P., Gerstenfeld, L. C., Rueger, J. M., Einhorn, T. A. and Amling, M. (2004). "Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo." Bone **35**(6): 1247-55.
- Leo, C., Giaccia, A. J. and Denko, N. C. (2004). "The hypoxic tumor microenvironment and gene expression." Semin Radiat Oncol **14**(3): 207-14.
- Li, B. J., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B. J., Woodle, M. C., Zhong, N. and Lu, P. Y. (2005). "Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque." Nat Med **11**(9): 944-51.
- Li, C., Takino, H., Eimoto, T., Ishida, T., Inagaki, A., Ueda, R., Suzuki, R., Yoshino, T., Nakagawa, A., Nakamura, S. and Inagaki, H. (2007). "Prognostic significance of NPM-ALK fusion transcript overexpression in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma." Mod Pathol **20**(6): 648-55.
- Li, G., Hu, Y., Huo, Y., Liu, M., Freeman, D., Gao, J., Liu, X., Wu, D. C. and Wu, H. (2006). "PTEN deletion leads to up-regulation of a secreted growth factor pleiotrophin." J Biol Chem **281**(16): 10663-8.
- Li, M. J., Bauer, G., Michienzi, A., Yee, J. K., Lee, N. S., Kim, J., Li, S., Castanotto, D., Zaia, J. and Rossi, J. J. (2003). "Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing Pol III-promoted anti-HIV RNAs." Mol Ther **8**(2): 196-206.
- Li, R. and Morris, S. W. (2008). "Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) small-molecule inhibitors for cancer therapy." Med Res Rev **28**(3): 372-412.
- Li, Y. S., Gurrieri, M. and Deuel, T. F. (1992). "Pleiotrophin gene expression is highly restricted and is regulated by platelet-derived growth factor." Biochem.Biophys.Res.Comm. **184**: 427-432.
- Li, Y. S., Hoffman, R. M., Le Beau, M. M., Espinosa, R., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G. and Deuel, T. F. (1992). "Characterization of the human pleiotrophin gene." J.Biol.Chem. **267**: 26011-26016.
- Li, Y. S., Milner, P. G., Chauhan, A. K., Watson, M. A., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Milbrandt, J. and Deuel, T. F. (1990). "Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity." Science **250**: 1690-1694.
- Lipardi, C., Wei, Q. and Paterson, B. M. (2001). "RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs." Cell **107**(3): 297-307.
- Liu, B., Qu, Y., Liu, S. and Ouyang, X. (2002). "Inhibition of telomerase in tumor cells by ribozyme targeting telomerase RNA component." Sci China C Life Sci **45**(1): 87-95.
- Loren, C. E., Scully, A., Grabbe, C., Edeen, P. T., Thomas, J., McKeown, M., Hunter, T. and Palmer, R. H. (2001). "Identification and characterization of DAlk: a novel Drosophila melanogaster RTK which drives ERK activation in vivo." Genes Cells **6**(6): 531-44.
- Lu, K. V., Jong, K. A., Kim, G. Y., Singh, J., Dia, E. Q., Yoshimoto, K., Wang, M. Y., Cloughesy, T. F., Nelson, S. F. and Mischel, P. S. (2005). "Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin." J Biol Chem **280**(29): 26953-64.
- Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T. and Gopferich, A. (2005). "Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems." Eur J Pharm Biopharm **60**(2): 247-66.

- Lupu, R., Wellstein, A., Sheridan, J., Ennis, B. W., Zugmaier, G., Katz, D., Lippman, M. E. and Dickson, R. B. (1992). "Purification and characterization of a novel growth factor from human breast cancer cells." Biochemistry **31**: 7330-7340.
- Ma, Z., Cools, J., Marynen, P., Cui, X., Siebert, R., Gesk, S., Schlegelberger, B., Peeters, B., De Wolf-Peeters, C., Wlodarska, I. and Morris, S. W. (2000). "Inv(2)(p23q35) in anaplastic large-cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis." Blood **95**(6): 2144-9.
- Maeda, N., Nishiwaki, T., Shintani, T., Hamanaka, H. and Noda, M. (1996). "6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/PTPRbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM)." J Biol Chem **271**: 21446-21452.
- Maeda, N. and Noda, M. (1998). "Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/PTPRbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration." J Cell Biol **142**(1): 203-16.
- Magnusson, P. U., Dimberg, A., Mellberg, S., Lukinius, A. and Claesson-Welsh, L. (2007). "FGFR-1 regulates angiogenesis through cytokines interleukin-4 and pleiotrophin." Blood **110**(13): 4214-22.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T. L., Postlethwait, P. and Nellen, W. (2002). "RNAi in Dictyostelium: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase." Mol Biol Cell **13**(2): 445-53.
- Marzec, M., Kasprzycka, M., Ptasznik, A., Wlodarski, P., Zhang, Q., Odum, N. and Wasik, M. A. (2005). "Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3." Lab Invest **85**(12): 1544-54.
- Mason, D. Y., Pulford, K. A., Bischof, D., Kuefer, M. U., Butler, L. H., Lamant, L., Delsol, G. and Morris, S. W. (1998). "Nucleolar localization of the nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase is not required for malignant transformation." Cancer Res **58**(5): 1057-62.
- Matsumoto, K., Wanaka, A., Mori, T., Taguchi, A., Ishii, N., Muramatsu, H., Muramatsu, T. and Tohyama, M. (1994a). "Localization of pleiotrophin and midkine in the postnatal developing cerebellum." Neurosci.Lett. **178**: 216-220.
- Matsumoto, K., Wanaka, A., Takatsuji, K., Muramatsu, H., Muramatsu, T. and Tohyama, M. (1994b). "A novel family of heparin-binding growth factors, pleiotrophin and midkine, is expressed in the developing rat cerebral cortex." Brain Res.Dev.Brain Res. **79**: 229-241.
- McCaffrey, A. P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F. H., Xu, H., Wieland, S. F., Marion, P. L. and Kay, M. A. (2003). "Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference." Nat Biotechnol **21**(6): 639-44.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. and Deuel, T. F. (2000). "Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2603-8.
- Mentlein, R. and Held-Feindt, J. (2002). "Pleiotrophin, an angiogenic and mitogenic growth factor, is expressed in human gliomas." J Neurochem **83**(4): 747-53.
- Mentlein, R. and Held-Feindt, J. (2003). "Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy?" Naturwissenschaften **90**(9): 385-94.

- Merenmies, J. and Rauvala, H. (1990). "Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain." J.Biol.Chem. **265**: 16721-16724.
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A. and Matzke, A. J. (2000). "Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA." Embo J **19**(19): 5194-201.
- Mi, R., Chen, W. and Hoke, A. (2007). "Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4664-9.
- Milner, P. G., Li, Y. S., Hoffman, R. M., Kodner, C. M., Siegel, N. R. and Deuel, T. F. (1989). "A novel 17 kD heparin-binding growth factor (HBGF-8) in bovine uterus: purification and N-terminal amino acid sequence." Biochem.Biophys.Res.Comm. **165**: 1096-1103.
- Milner, P. G., Shah, D., Veile, R., Donis-Keller, H. and Kumar, B. V. (1992). "Cloning, nucleotide sequence and chromosome localization of the human pleiotrophin gene." Biochemistry **31**: 12023-12028.
- Mine, A. and Okuno, T. (2008). "Viruses and RNA silencing." Uirusu **58**(1): 61-8.
- Mishima, K., Asai, A., Kadomatsu, K., Ino, Y., Nomura, K., Narita, Y., Muramatsu, T. and Kirino, T. (1997). "Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas." Neurosci Lett **233**(1): 29-32.
- Mitsiadis, T. A., Salmivirta, M., Muramatsu, T., Muramatsu, H., Rauvala, H., Lehtonen, E., Jalkanen, M. and Thesleff, I. (1995). "Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis." Development **121**: 37-51.
- Miyake, I., Hakomori, Y., Shinohara, A., Gamou, T., Saito, M., Iwamatsu, A. and Sakai, R. (2002). "Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines." Oncogene **21**(38): 5823-34.
- Moog-Lutz, C., Degoutin, J., Gouzi, J. Y., Frobert, Y., Brunet-de Carvalho, N., Bureau, J., Creminon, C. and Vigny, M. (2005). "Activation and inhibition of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase by monoclonal antibodies and absence of agonist activity of pleiotrophin." J Biol Chem **280**(28): 26039-48.
- Moon, H. S., Park, W. I., Sung, S. H., Choi, E. A., Chung, H. W. and Woo, B. H. (2003). "Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer." Gynecol Oncol **88**(3): 289-97.
- Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E. and Looney, D. J. (2004). "Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells." Science **305**(5688): 1289-92.
- Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L. and Look, A. T. (1994). "Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non- Hodgkin's lymphoma." Science **263**(5151): 1281-4.
- Morris, S. W., Naeve, C., Mathew, P., James, P. L., Kirstein, M. N., Cui, X. and Witte, D. P. (1997). "ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)." Oncogene **14**: 2175-2188.
- Morris, S. W., Xue, L., Ma, Z. and Kinney, M. C. (2001). "Alk+ CD30+ lymphomas: a distinct molecular genetic subtype of non-Hodgkin's lymphoma." Br J Haematol **113**(2): 275-95.

- Morrissey, D. V., Lockridge, J. A., Shaw, L., Blanchard, K., Jensen, K., Breen, W., Hartsough, K., Machemer, L., Radka, S., Jadhav, V., Vaish, N., Zinnen, S., Vargeese, C., Bowman, K., Shaffer, C. S., Jeffs, L. B., Judge, A., MacLachlan, I. and Polisky, B. (2005). "Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs." Nat Biotechnol **23**(8): 1002-7.
- Motegi, A., Fujimoto, J., Kotani, M., Sakuraba, H. and Yamamoto, T. (2004). "ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth." J Cell Sci **117**(Pt 15): 3319-29.
- Mourali, J., Benard, A., Lourenco, F. C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P., Delsol, G. and Allouche, M. (2006). "Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage." Mol Cell Biol **26**(16): 6209-22.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A. and Vaucheret, H. (2000). "Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance." Cell **101**(5): 533-42.
- Muller, S., Kunkel, P., Lamszus, K., Ulbricht, U., Lorente, G. A., Nelson, A. M., von Schack, D., Chin, D. J., Lohr, S. C., Westphal, M. and Melcher, T. (2003). "A role for receptor tyrosine phosphatase zeta in glioma cell migration." Oncogene **22**(43): 6661-8.
- Muramatsu, T. (2002). "Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis." J Biochem **132**(3): 359-71.
- Nakagawara, A., Milbrandt, J., Muramatsu, T., Deuel, T. F., Zhao, H., Cnaan, A. and Brodeur, G. M. (1995). "Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas." Cancer Res. **55**: 1792-1797.
- Nakanishi, T., Kadomatsu, K., Okamoto, T., Tomoda, Y. and Muramatsu, T. (1997). "Expression of midkine and pleiotropin in ovarian tumors." Obstet.Gynecol. **90**: 285-290.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell **2**(4): 279-289.
- Nieborowska-Skorska, M., Slupianek, A., Xue, L., Zhang, Q., Raghunath, P. N., Hoser, G., Wasik, M. A., Morris, S. W. and Skorski, T. (2001). "Role of signal transducer and activator of transcription 5 in nucleophosmin/ anaplastic lymphoma kinase-mediated malignant transformation of lymphoid cells." Cancer Res **61**(17): 6517-23.
- Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P. and Sharp, P. A. (2002). "siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection." Nat Med **8**(7): 681-6.
- Nykanen, A., Haley, B. and Zamore, P. D. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." Cell **107**(3): 309-21.
- Osajima-Hakomori, Y., Miyake, I., Ohira, M., Nakagawara, A., Nakagawa, A. and Sakai, R. (2005). "Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma." Am J Pathol **167**(1): 213-22.
- Packham, E. A. and Brook, J. D. (2003). "T-box genes in human disorders." Hum Mol Genet **12 Spec No 1**: R37-44.

- Papadimitriou, E., Heroult, M., Courty, J., Polykratis, A., Stergiou, C. and Katsoris, P. (2000). "Endothelial cell proliferation induced by HARP: implication of N or C terminal peptides." Biochem Biophys Res Commun **274**(1): 242-8.
- Pariser, H., Ezquerra, L., Herradon, G., Perez-Pinera, P. and Deuel, T. F. (2005). "Fyn is a downstream target of the pleiotrophin/receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta-signaling pathway: regulation of tyrosine phosphorylation of Fyn by pleiotrophin." Biochem Biophys Res Commun **332**(3): 664-9.
- Pariser, H., Herradon, G., Ezquerra, L., Perez-Pinera, P. and Deuel, T. F. (2005). "Pleiotrophin regulates serine phosphorylation and the cellular distribution of beta-adducin through activation of protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12407-12.
- Pariser, H., Perez-Pinera, P., Ezquerra, L., Herradon, G. and Deuel, T. F. (2005). "Pleiotrophin stimulates tyrosine phosphorylation of beta-adducin through inactivation of the transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta." Biochem Biophys Res Commun **335**(1): 232-9.
- Parsons, R. and Simpson, L. (2003). "PTEN and cancer." Methods Mol Biol **222**: 147-66.
- Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I. and Engelke, D. R. (2002). "Effective expression of small interfering RNA in human cells." Nat Biotechnol **20**(5): 505-8.
- Perez-Pinera, P., Alcantara, S., Dimitrov, T., Vega, J. A. and Deuel, T. F. (2006). "Pleiotrophin disrupts calcium-dependent homophilic cell-cell adhesion and initiates an epithelial-mesenchymal transition." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17795-800.
- Perez-Pinera, P., Chang, Y., Astudillo, A., Mortimer, J. and Deuel, T. F. (2007). "Anaplastic lymphoma kinase is expressed in different subtypes of human breast cancer." Biochem Biophys Res Commun **358**(2): 399-403.
- Perez-Pinera, P., Zhang, W., Chang, Y., Vega, J. A. and Deuel, T. F. (2007). "Anaplastic lymphoma kinase is activated through the pleiotrophin/receptor protein-tyrosine phosphatase beta/zeta signaling pathway: an alternative mechanism of receptor tyrosine kinase activation." J Biol Chem **282**(39): 28683-90.
- Pillay, K., Govender, D. and Chetty, R. (2002). "ALK protein expression in rhabdomyosarcomas." Histopathology **41**(5): 461-7.
- Pley, H. W., Flaherty, K. M. and McKay, D. B. (1994). "Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme [see comments]." Nature **372**: 68-74.
- Polykratis, A., Delbe, J., Courty, J., Papadimitriou, E. and Katsoris, P. (2004). "Identification of heparin affin regulatory peptide domains with potential role on angiogenesis." Int J Biochem Cell Biol **36**(10): 1954-66.
- Polykratis, A., Katsoris, P., Courty, J. and Papadimitriou, E. (2005). "Characterization of heparin affin regulatory peptide signaling in human endothelial cells." J Biol Chem **280**(23): 22454-61.
- Polytarchou, C., Hatziapostolou, M. and Papadimitriou, E. (2005). "Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affin regulatory peptide gene." J Biol Chem **280**(49): 40428-35.
- Porsch, M., Hofmeyer, K., Bausenwein, B. S., Grimm, S., Weber, B. H., Miassod, R. and Pflugfelder, G. O. (1998). "Isolation of a Drosophila T-box gene closely related to human TBX1." Gene **212**(2): 237-48.

- Powers, C., Aigner, A., Stoica, G. E., McDonnell, K. and Wellstein, A. (2002). "Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth." J Biol Chem **277**(16): 14153-8.
- Propsting, M. J., Kubicka, S., Genschel, J., Manns, M. P., Lochs, H. and Schmidt, H. H. (2000). "Inhibition of transthyretin-met30 expression using Inosine(15.1)-Hammerhead ribozymes in cell culture." Biochem Biophys Res Commun **279**(3): 970-3.
- Pulford, K., Falini, B., Cordell, J., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., MacLennan, K. A., Lamant, L., Carbone, A., Campo, E. and Mason, D. Y. (1999). "Biochemical detection of novel anaplastic lymphoma kinase proteins in tissue sections of anaplastic large cell lymphoma." Am J Pathol **154**(6): 1657-63.
- Pulford, K., Lamant, L., Morris, S. W., Butler, L. H., Wood, K. M., Stroud, D., Delsol, G. and Mason, D. Y. (1997). "Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1." Blood **89**: 1394-1404.
- Raetz, E. A., Perkins, S. L., Carlson, M. A., Schooler, K. P., Carroll, W. L. and Virshup, D. M. (2002). "The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase fusion protein induces c-Myc expression in pediatric anaplastic large cell lymphomas." Am J Pathol **161**(3): 875-83.
- Raulo, E., Chernousov, M. A., Carey, D. J., Nolo, R. and Rauvala, H. (1994). "Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3)." J.Biol.Chem. **269**: 12999-13004.
- Raulo, E., Julkunen, I., Merenmies, J., Pihlaskari, R. and Rauvala, H. (1992). "Secretion and biological activities of heparin-binding growth-associated molecule. Neurite outgrowth-promoting and mitogenic actions of the recombinant and tissue-derived protein." J.Biol.Chem. **267**: 11408-11416.
- Rauvala, H. (1989). "An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors." EMBO J. **8**: 2933-2941.
- Rauvala, H., Huttunen, H. J., Fages, C., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Imai, S., Raulo, E. and Kilpelainen, I. (2000). "Heparin-binding proteins HB-GAM (pleiotrophin) and amphoterin in the regulation of cell motility." Matrix Biol **19**(5): 377-87.
- Rauvala, H., Pihlaskari, R., Laitinen, J. and Merenmies, J. (1989). "Extracellular adhesive molecules in neurite growth." Biosci.Rep. **9**: 1-12.
- Rauvala, H., Vanhala, A., Castren, E., Nolo, R., Raulo, E., Merenmies, J. and Panula, P. (1994). "Expression of HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecules) in the pathways of developing axonal processes in vivo and neurite outgrowth in vitro induced by HB-GAM." Brain Res.Dev Brain Res. **79**: 157-176.
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A. E., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R. and Harris, A. L. (1997). "Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis." Cancer Res. **57**: 963-969.
- Rosenwald, A., Ott, G., Pulford, K., Katzenberger, T., Kuhl, J., Kalla, J., Ott, M. M., Mason, D. Y. and Muller-Hermelink, H. K. (1999). "t(1;2)(q21;p23) and t(2;3)(p23;q21): two novel variant translocations of the t(2;5)(p23;q35) in anaplastic large cell lymphoma." Blood **94**(1): 362-4.

- Ruhl, M., Sahin, E., Johannsen, M., Somasundaram, R., Manski, D., Riecken, E. O. and Schuppan, D. (1999). "Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax." J Biol Chem **274**(48): 34361-8.
- Rustin, G. and Rehman, F. (2008). "State-of-the-art approach in selective curable tumors: germ cell tumors." Ann Oncol **19 Suppl 7**: vii161-5.
- Ryu, K. J., Kim, J. H. and Lee, S. W. (2003). "Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing." Mol Ther **7**(3): 386-95.
- Schatzlein, A. G. (2001). "Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress." Anticancer Drugs **12**(4): 275-304.
- Scheijen, B. and Griffin, J. D. (2002). "Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease." Oncogene **21**(21): 3314-33.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-25.
- Schulte, A. M., Lai, S., Kurtz, A., Czubayko, F., Riegel, A. T. and Wellstein, A. (1996). "Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14759-64.
- Schulte, A. M. and Wellstein, A. (1997). Pleiotrophin and related molecules. Tumour Angiogenesis. R. Bicknell, C. M. Lewis and N. Ferrara. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press: 273-289.
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D. and Wrensch, M. (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma." Nat Clin Pract Neurol **2**(9): 494-503; quiz 1 p following 516.
- Scott, W. G., Finch, J. T. and Klug, A. (1995). "The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage." Cell **81**: 991-1002.
- Shao, C. K., Su, Z. L., Feng, Z. Y., Rao, H. L. and Tang, L. Y. (2002). "[Significance of ALK gene expression in neoplasms and normal tissues]." Ai Zheng **21**(1): 58-62.
- Sharifi, B. G., Zeng, Z., Wang, L., Song, L., Chen, H., Qin, M., Sierra-Honigmann, M. R., Wachsmann-Hogiu, S. and Shah, P. K. (2006). "Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(6): 1273-80.
- Shen, J., Samul, R., Silva, R. L., Akiyama, H., Liu, H., Saishin, Y., Hackett, S. F., Zinnen, S., Kossen, K., Fosnaugh, K., Vargeese, C., Gomez, A., Bouhana, K., Aitchison, R., Pavco, P. and Campochiaro, P. A. (2006). "Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1." Gene Ther **13**(3): 225-34.
- Shiota, M., Fujimoto, J., Semba, T., Satoh, H., Yamamoto, T. and Mori, S. (1994a). "Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3." Oncogene **9**(6): 1567-74.
- Shiota, M., Fujimoto, J., Takenaga, M., Satoh, H., Ichinohasama, R., Abe, M., Nakano, M., Yamamoto, T. and Mori, S. (1994b). "Diagnosis of t(2;5)(p23;q35)-associated Ki-1 lymphoma with immunohistochemistry." Blood **84**(11): 3648-52.
- Shiota, M., Nakamura, S., Ichinohasama, R., Abe, M., Akagi, T., Takeshita, M., Mori, N., Fujimoto, J., Miyauchi, J., Mikata, A., Nanba, K., Takami, T., Yamabe, H., Takano, Y., Izumo, T., Nagatani, T., Mohri, N., Nasu, K., Satoh, H., Katano, H.,

- Fujimoto, J., Yamamoto, T. and Mori, S. (1995). "Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity." Blood **86**(5): 1954-60.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. and Fire, A. (2001). "On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing." Cell **107**(4): 465-76.
- Silos-Santiago, I., Yeh, H. J., Gurrieri, M. A., Guillerman, R. P., Li, Y. S., Wolf, J., Snider, W. and Deuel, T. F. (1996). "Localization of pleiotrophin and its mRNA in subpopulations of neurons and their corresponding axonal tracts suggests important roles in neural-glia interactions during development and in maturity." J Neurobiol. **31**: 283-296.
- Sioud, M. (2006a). "RNA interference below the immune radar." Nat Biotechnol **24**(5): 521-2.
- Sioud, M. (2006b). "Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: A central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses." Eur J Immunol **36**(5): 1222-30.
- Slupianek, A., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Morrione, A., Majewski, M., Xue, L., Morris, S. W., Wasik, M. A. and Skorski, T. (2001). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis." Cancer Res **61**(5): 2194-9.
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y. and Mano, H. (2007). "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer." Nature **448**(7153): 561-6.
- Sohail, M., Doran, G., Riedemann, J., Macaulay, V. and Southern, E. M. (2003). "A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy." Nucleic Acids Res **31**(7): e38.
- Song, E., Lee, S. K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. and Lieberman, J. (2003). "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis." Nat Med **9**(3): 347-51.
- Soulie, P., Heroult, M., Bernard-Pierrot, I., Caruelle, D., Oglobine, J., Barritault, D. and Courty, J. (2004). "Correlation of elevated plasma levels of two structurally related growth factors, heparin affinity regulatory peptide and midkine, in advanced solid tumor patients." Cancer Detect Prev **28**(5): 319-24.
- Souttou, B., Carvalho, N. B., Raulais, D. and Vigny, M. (2001). "Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway." J Biol Chem **276**(12): 9526-31.
- Souttou, B., Juhl, H., Hackenbruck, J., Rockseisen, M., Klomp, H. J., Raulais, D., Vigny, M. and Wellstein, A. (1998). "Relationship between serum concentrations of the growth factor pleiotrophin and pleiotrophin-positive tumors." J Natl Cancer Inst **90**(19): 1468-73.
- Stein, H., Foss, H. D., Durkop, H., Marafioti, T., Delsol, G., Pulford, K., Pileri, S. and Falini, B. (2000). "CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features." Blood **96**(12): 3681-95.
- Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D. J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A. T. and Wellstein, A. (2001). "Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin." J Biol Chem **276**(20): 16772-9.

- Stoica, G. E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E. T., Sale, E. B., Riegel, A. T. and Wellstein, A. (2002). "Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types." J Biol Chem **277**(39): 35990-8.
- Sumi, Y., Muramatsu, H., Takei, Y., Hata, K., Ueda, M. and Muramatsu, T. (2002). "Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model." J Cell Sci **115**(Pt 13): 2659-67.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. and Mello, C. C. (1999). "The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." Cell **99**(2): 123-32.
- Tabler, M., Homann, M., Tzortzakaki, S. and Sczakiel, G. (1994). "A three-nucleotide helix I is sufficient for full activity of a hammerhead ribozyme: advantages of an asymmetric design." Nucleic Acids Res. **22**: 3958-3965.
- Takeda, A., Onodera, H., Sugimoto, A., Itoyama, Y., Kogure, K., Rauvala, H. and Shibahara, S. (1995). "Induction of heparin-binding growth-associated molecule expression in reactive astrocytes following hippocampal neuronal injury." Neuroscience **68**: 57-64.
- Tamura, H., Fukada, M., Fujikawa, A. and Noda, M. (2006). "Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP." Neurosci Lett **399**(1-2): 33-8.
- Tare, R. S., Oreffo, R. O., Clarke, N. M. and Roach, H. I. (2002a). "Pleiotrophin/Osteoblast-stimulating factor 1: dissecting its diverse functions in bone formation." J Bone Miner Res **17**(11): 2009-20.
- Tare, R. S., Oreffo, R. O., Sato, K., Rauvala, H., Clarke, N. M. and Roach, H. I. (2002b). "Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development." Biochem Biophys Res Commun **298**(3): 324-32.
- Tezuka, K., Takeshita, S., Hakeda, Y., Kumegawa, M., Kikuno, R. and Hashimoto-Gotoh, T. (1990). "Isolation of mouse and human cDNA clones encoding a protein expressed specifically in osteoblasts and brain tissues." Biochem. Biophys. Res. Commun. **173**: 246-251.
- Thybusch-Bernhardt, A., Aigner, A., Beckmann, S., Czubyko, F. and Juhl, H. (2001). "Ribozyme targeting of HER-2 inhibits pancreatic cancer cell growth in vivo." Eur J Cancer **37**(13): 1688-94.
- Tilly, G., Chapuis, J., Vilette, D., Laude, H. and Vilotte, J. L. (2003). "Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 548-51.
- Ting, A. H., Schuebel, K. E., Herman, J. G. and Baylin, S. B. (2005). "Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation." Nat Genet **37**(8): 906-10.
- Tong, Y., Mentlein, R., Buhl, R., Hugo, H. H., Krause, J., Mehdorn, H. M. and Held-Feindt, J. (2007). "Overexpression of midkine contributes to anti-apoptotic effects in human meningiomas." J Neurochem **100**(4): 1097-107.
- Tort, F., Campo, E., Pohlman, B. and Hsi, E. (2004). "Heterogeneity of genomic breakpoints in MSN-ALK translocations in anaplastic large cell lymphoma." Hum Pathol **35**(8): 1038-41.
- Tort, F., Pinyol, M., Pulford, K., Roncador, G., Hernandez, L., Nayach, I., Kluin-Nelemans, H. C., Kluin, P., Touriol, C., Delsol, G., Mason, D. and Campo, E. (2001). "Molecular characterization of a new ALK translocation involving

- moesin (MSN-ALK) in anaplastic large cell lymphoma." *Lab Invest* **81**(3): 419-26.
- Touriol, C., Greenland, C., Lamant, L., Pulford, K., Bernard, F., Rousset, T., Mason, D. Y. and Delsol, G. (2000). "Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like)." *Blood* **95**(10): 3204-7.
- Trinei, M., Lanfrancone, L., Campo, E., Pulford, K., Mason, D. Y., Pelicci, P. G. and Falini, B. (2000). "A new variant anaplastic lymphoma kinase (ALK)-fusion protein (ATIC-ALK) in a case of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma." *Cancer Res* **60**(4): 793-8.
- Turner, S. D. and Alexander, D. R. (2005). "What have we learnt from mouse models of NPM-ALK-induced lymphomagenesis?" *Leukemia* **19**(7): 1128-34.
- Turner, S. D., Tooze, R., MacLennan, K. and Alexander, D. R. (2003). "Vav-promoter regulated oncogenic fusion protein NPM-ALK in transgenic mice causes B-cell lymphomas with hyperactive Jun kinase." *Oncogene* **22**(49): 7750-61.
- Turturro, F. (2003). "Recombinant adenovirus-mediated cytotoxic gene therapy of lymphoproliferative disorders: is CAR important for the vector to ride?" *Gene Ther* **10**(2): 100-4.
- Turturro, F., Arnold, M. D., Frist, A. Y. and Pulford, K. (2002). "Model of inhibition of the NPM-ALK kinase activity by herbimycin A." *Clin Cancer Res* **8**(1): 240-5.
- Ulbricht, U., Brockmann, M. A., Aigner, A., Eckerich, C., Muller, S., Fillbrandt, R., Westphal, M. and Lamszus, K. (2003). "Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase zeta and its ligand pleiotrophin in human astrocytomas." *J Neuropathol Exp Neurol* **62**(12): 1265-75.
- Ulbricht, U., Eckerich, C., Fillbrandt, R., Westphal, M. and Lamszus, K. (2006). "RNA interference targeting protein tyrosine phosphatase zeta/receptor-type protein tyrosine phosphatase beta suppresses glioblastoma growth in vitro and in vivo." *J Neurochem* **98**(5): 1497-506.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F. and Aigner, A. (2005). "RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo." *Gene Ther* **12**(5): 461-6.
- Vacherot, F., Caruelle, D., Chopin, D., Gil-Diez, S., Barritault, D., Caruelle, J. P. and Courty, J. (1999). "Involvement of heparin affin regulatory peptide in human prostate cancer." *Prostate* **38**(2): 126-36.
- Vanderwinden, J. M., Mailleux, P., Schiffmann, S. N. and Vanderhaeghen, J. J. (1992). "Cellular distribution of the new growth factor pleiotrophin (HB- GAM) mRNA in developing and adult rat tissues." *Anat Embryol (Berl)* **186**: 387-406.
- Ventura, R. A., Martin-Subero, J. I., Knippschild, U., Gascoyne, R. D., Delsol, G., Mason, D. Y. and Siebert, R. (2004). "Centrosome abnormalities in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma." *Leukemia* **18**(11): 1910-1.
- Vernersson, E., Khoo, N. K., Henriksson, M. L., Roos, G., Palmer, R. H. and Hallberg, B. (2006). "Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice." *Gene Expr Patterns* **6**(5): 448-61.
- Walters, D. K. and Jelinek, D. F. (2002). "The effectiveness of double-stranded short inhibitory RNAs (siRNAs) may depend on the method of transfection." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **12**(6): 411-8.
- Wanaka, A., Carroll, S. L. and Milbrandt, J. (1993). "Developmentally regulated expression of pleiotrophin, a novel heparin binding growth factor, in the nervous system of the rat." *Brain Res Dev Brain Res* **72**: 133-144.

- Weber, D., Klomp, H. J., Czubayko, F., Wellstein, A. and Juhl, H. (2000). "Pleiotrophin can be rate-limiting for pancreatic cancer cell growth." Cancer Res **60**(18): 5284-8.
- Weidner, N., Semple, J. P. and Welch, W. R. (1991). "Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma." N.Engl.J.Med. **324**: 1-8.
- Weigelt, B., Glas, A. M., Wessels, L. F., Witteveen, A. T., Peterse, J. L. and van't Veer, L. J. (2003). "Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15901-5.
- Weiss, J. B., Suyama, K. L., Lee, H. H. and Scott, M. P. (2001). "Jelly belly: a Drosophila LDL receptor repeat-containing signal required for mesoderm migration and differentiation." Cell **107**(3): 387-98.
- Wellmann, A., Doseeva, V., Butscher, W., Raffeld, M., Fukushima, P., Stetler-Stevenson, M. and Gardner, K. (1997). "The activated anaplastic lymphoma kinase increases cellular proliferation and oncogene up-regulation in rat 1a fibroblasts." Faseb J **11**(12): 965-72.
- Wellstein, A., Fang, W. J., Khatri, A., Lu, Y., Swain, S. S., Dickson, R. B., Sasse, J., Riegel, A. T. and Lippman, M. E. (1992). "A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine." J.Biol.Chem. **267**: 2582-2587.
- Wightman, L., Kircheis, R., Rossler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kurs, M. and Wagner, E. (2001). "Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo." J Gene Med **3**(4): 362-72.
- Wilda, M., Fuchs, U., Wossmann, W. and Borkhardt, A. (2002). "Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)." Oncogene **21**(37): 5716-24.
- Wisniewski, T., Lalowski, M., Baumann, M., Rauvala, H., Raulo, E., Nolo, R. and Frangione, B. (1996). "HB-GAM is a cytokine present in Alzheimer's and Down's syndrome lesions." Neuroreport **7**: 667-671.
- Wu, H., Barusevicius, A., Babb, J., Klein-Szanto, A., Godwin, A., Elenitsas, R., Gelfand, J. M., Lessin, S. and Seykora, J. T. (2005). "Pleiotrophin expression correlates with melanocytic tumor progression and metastatic potential." J Cutan Pathol **32**(2): 125-30.
- Wu, H. N., Lin, Y. J., Lin, F. P., Makino, S., Chang, M. F. and Lai, M. M. (1989). "Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **86**: 1831-1835.
- Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P. and Davis, C. G. (2001). "Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy." Crit Rev Oncol Hematol **38**(1): 17-23.
- Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P., Davis, C. G. and Jakobovits, A. (1999). "Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy." Cancer Res **59**(6): 1236-43.
- Yeh, H. J., He, Y. Y., Xu, J., Hsu, C. Y. and Deuel, T. F. (1998). "Upregulation of pleiotrophin gene expression in developing microvasculature, macrophages, and astrocytes after acute ischemic brain injury." J Neurosci **18**(10): 3699-707.
- Yeh, H. S., Chen, H., Manyak, S. J., Swift, R. A., Campbell, R. A., Wang, C., Li, M., Lee, H. J., Waterman, G., Gordon, M. S., Ma, J., Bonavida, B. and Berenson, J. R. (2006). "Serum pleiotrophin levels are elevated in multiple myeloma patients and correlate with disease status." Br J Haematol **133**(5): 526-9.

- Yin, J. Q., Gao, J., Shao, R., Tian, W. N., Wang, J. and Wan, Y. (2003). "siRNA agents inhibit oncogene expression and attenuate human tumor cell growth." J Exp Ther Oncol **3**(4): 194-204.
- Yokota, T., Iijima, S., Kubodera, T., Ishii, K., Katakai, Y., Ageyama, N., Chen, Y., Lee, Y. J., Unno, T., Nishina, K., Iwasaki, Y., Maki, N., Mizusawa, H. and Akari, H. (2007). "Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C." Biochem Biophys Res Commun **361**(2): 294-300.
- Zamo, A., Chiarle, R., Piva, R., Howes, J., Fan, Y., Chilosi, M., Levy, D. E. and Inghirami, G. (2002). "Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death." Oncogene **21**(7): 1038-47.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.
- Zhang, L., Mabuchi, T., Satoh, E., Maeda, S., Nukui, H. and Naganuma, H. (2004). "Overexpression of heparin-binding growth-associated molecule in malignant glioma cells." Neurol Med Chir (Tokyo) **44**(12): 637-43; discussion 644-5.
- Zhang, M. L., Yan, Y. C., Sun, Y. P. and Koide, S. S. (1997). "Identification and expression of epidermal growth factor gene in mouse testis." Cell Res **7**(1): 51-9.
- Zhang, N. and Deuel, T. F. (1999). "Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors." Curr Opin Hematol **6**(1): 44-50.
- Zhang, N., Zhong, R., Perez-Pinera, P., Herradon, G., Ezquerra, L., Wang, Z. Y. and Deuel, T. F. (2006). "Identification of the angiogenesis signaling domain in pleiotrophin defines a mechanism of the angiogenic switch." Biochem Biophys Res Commun **343**(2): 653-8.
- Zhang, N., Zhong, R., Wang, Z. Y. and Deuel, T. F. (1997). "Human breast cancer growth inhibited in vivo by a dominant negative pleiotrophin mutant." J Biol Chem **272**: 16733-16736.
- Zhang, Q., Raghunath, P. N., Xue, L., Majewski, M., Carpentieri, D. F., Odum, N., Morris, S., Skorski, T. and Wasik, M. A. (2002). "Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma." J Immunol **168**(1): 466-74.
- Zhang, Y., Zhang, Y. F., Bryant, J., Charles, A., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (2004). "Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer." Clin Cancer Res **10**(11): 3667-77.

9 Abkürzungsverzeichnis

ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BSA	bovines Serumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
ECM	extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GRB2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IRS-1	Insulin Receptor Substrate 1
JAK	Januskinasen
LTP	Long Term Potentiation
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MK	Midkine
mRNA	Messenger Ribunocleic Acid
NGF	Nerve Growth Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphoinositol-3-Phosphat-Kinase
PLC- γ	Phosphoinositid-Phospholipase C γ
PTN	Pleiotrophin
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog

PTP	Proteintyrosinphosphatase
PTPR.....	Rezeptor Proteintyrosinphosphatase
RAS	Rat Sarcoma
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNAi.....	RNA-Interferenz
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
Rz.....	Ribozym
SDS.....	Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SHC	Src homology 2 domain containing transforming protein 1
siRNA	Small Interfering RNA
SRC.....	Familie protoonkogener Tyrosinkinasen
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBST	Tris buffered saline - Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF.....	Transforming Growth Factor
Tris.....	Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan
VEGF.....	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO.....	World Health Organization
ZNS.....	zentrales Nervensystem

10 Anhang

10.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Düsseldorf: Ernst, Decker, Kläui, Knust, Kowallik, Mehlhorn, Wagner, Wunderlich

Lodz/Polen: Długonski, Godlewski, Jaworski, Kononowicz, Krajewska, Rudnicka,
Sidorczyk

Marburg: Aigner, Aumüller, Bakowsky, Czubayko, Dietrich, Eilers, Gudermann,
Hasilik, Löffler, Lohoff, Müller, Neubauer, Plant, Schäfer

10.2 Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Aigner für das Thema meiner Doktorarbeit, seine hervorragende Betreuung und unerschöpfliche Geduld bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen zahlreichen Ideen, kompetenten Ratschlägen und ausführlichen Diskussionen immer wieder vorangetrieben. Mein großer Dank gilt Prof. Dr. F. Czubayko für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit an seinem Institut. Bei Thomas Büch, Maike Gold, Florian Steinberg und Nicole Bader möchte ich mich für die ausgezeichnete und enge Zusammenarbeit und Hilfestellung bedanken. Andrea Wüstenhagen danke ich herzlich für die sehr nette und gründliche Einarbeitung. Ich danke allen, die mich während der Doktorarbeit unterstützt und für die erforderliche Abwechslung gesorgt haben, insbesondere Julia Hagenbusch, Sabrina Höbel, Tanja Pfeffer-Eckel, Hermann Kalwa, Thomas Hofmann, Beata Urban-Klein, Stephanie Werth und Helga Radler. Ich danke meiner Familie für die Ermöglichung meiner Ausbildung und die moralische Unterstützung.